

# **Vergleichende Untersuchungen von Schlüsselkomponenten aus Dämpfen der E-Zigarette**

---

**Agnes Johanna Buczkowski**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
"doctor rerum naturalium"  
(Dr. rer. nat.)  
in der Wissenschaftsdisziplin "Lebensmittelchemie"

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Institut für Ernährungswissenschaft  
der Universität Potsdam

Potsdam, 13.10.2022

Hauptbetreuer: apl. Prof. Dr. Harshadrai M. Rawel  
Betreuer: Prof. Dr. Hans-Peter Welzel  
2. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Bereswill  
3. Gutachter: Dr.-Ing. habil. Oliver Schlüter

Published online on the  
Publication Server of the University of Potsdam:  
<https://doi.org/10.25932/publishup-56561>  
<https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:kobv:517-opus4-565617>

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>8</b>
<b>Abkürzungen und Symbole</b>	<b>11</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>12</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>15</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>17</b>
<b>2. THEORETISCHER HINTERGRUND</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Inhalation</b>	<b>20</b>
2.1.1 Inhalation von Wirkstoffen	22
2.1.2 Technologien zur Inhalation von Substanzen	29
2.1.3 Technologie der e-Zigarette	35
<b>2.2 Modellsubstanzen als Wirkstoffe in Liquids</b>	<b>45</b>
2.2.1 Ätherische Öle	45
2.2.2 Cannabidiol	52
2.2.3 Tobramycin	54
2.2.4 Hilfsstoffe	55
<b>3. ZIELSTELLUNG</b>	<b>58</b>
<b>4. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Material</b>	<b>59</b>
4.1.1 Wirkstoffe	59
4.1.2 Vehikel	60
4.1.3 Liquids	61
4.1.4 Extrakte und Liquids aus unbehandeltem und decarboxyliertem Pflanzenmaterial	62
<b>4.2 Methoden</b>	<b>64</b>
4.2.1 Grundlagen	64
4.2.2 Quantitative und qualitative Untersuchungen der Liquids bzw. Aerosole	69
4.2.3 Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymsystemen <i>in vitro</i>	76
4.2.4 Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole <i>in vitro</i>	79
4.2.5 Statistische Auswertung	87
<b>5. ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>88</b>
<b>5.1 Quantitative und qualitative Untersuchungen der Liquids bzw. Aerosole</b>	<b>88</b>
<b>5.2 Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymsystemen <i>in vitro</i></b>	<b>106</b>
5.2.1 Direkte Inkubation	108
5.2.2 Aerosol-Untersuchungen	109
<b>5.3 Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole <i>in vitro</i></b>	<b>114</b>
5.3.1 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Liquids (direkte Methoden)	114
5.3.2 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Aerosolen (indirekte Methoden)	131
<b>6. FAZIT UND AUSBLICK</b>	<b>143</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>149</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>163</b>
<b>Veröffentlichungen</b>	<b>165</b>

<b>Danksagung</b>	<b>166</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>167</b>
<b>8. ANHANG</b>	<b>168</b>
<b>8.1 Material</b>	<b>168</b>
8.1.1 Chemikalien	168
8.1.2 Geräte	169
8.1.3 Verbrauchsmaterialien	170
8.1.4 Analysenzertifikate der Wirkstoffe	171
<b>8.2 Methoden</b>	<b>178</b>
8.2.1 Wirkstoffhaltige Liquids	178
8.2.2 Biologische Suspensionen	178
8.2.3 Reagenzien für das $\alpha$ -Amylase-Assay	179
8.2.4 Reagenzien für das Protease-Assay	179
8.2.5 Flüssige Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen	180
<b>8.3 Validierung der chromatographischen Methoden</b>	<b>181</b>

## Zusammenfassung

Respiratorische Erkrankungen stellen zunehmend eine relevante globale Problematik dar. Die Erweiterung bzw. Modifizierung von Applikationswegen möglicher Arzneimittel für gezielte topische Anwendungen ist dabei von größter Bedeutung. Die Variation eines bekannten Applikationsweges durch unterschiedliche technologische Umsetzungen kann die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten, aber auch die Patienten-Compliance erhöhen. Die einfache und flexible Verfahrensweise durch schnelle Verfügbarkeit und eine handliche Technologie sind heutzutage wichtige Eigenschaften im Entwicklungsprozess eines Produktes. Eine direkte topische Behandlung von Atemwegserkrankungen am Wirkort in Form einer inhalativen Applikation bietet dabei viele Vorteile gegenüber einer systemischen Therapie. Die medizinische Inhalation von Wirkstoffen über die Lunge ist jedoch eine komplexe Herausforderung. Inhalatoren gehören zu den erklärungsbedürftigen Applikationsformen, die zur Erhöhung der konsequenten Einhaltung der Verordnung so einfach, wie möglich gestaltet werden müssen. Parallel besitzen und nutzen weltweit annähernd 68 Millionen Menschen die Technologie eines inhalativen Applikators zur bewussten Schädigung ihrer Gesundheit in Form einer elektronischen Zigarette. Diese bekannte Anwendung bietet die potentielle Möglichkeit einer verfügbaren, kostengünstigen und qualitätsgeprüften Gesundheitsmaßnahme zur Kontrolle, Prävention und Heilung von Atemwegserkrankungen. Sie erzeugt ein Aerosol durch elektrothermische Erwärmung eines sogenannten Liquids, das durch Kapillarkräfte eines Trägermaterials an ein Heizelement gelangt und verdampft. Ihr Bekanntheitsgrad zeigt, dass eine beabsichtigte Wirkung in den Atemwegen eintritt. Diese Wirkung könnte jedoch auch auf potentielle pharmazeutische Einsatzgebiete übertragbar sein. Die Vorteile der pulmonalen Verabreichung sind dabei vielfältig. Im Vergleich zur peroralen Applikation gelangt der Wirkstoff gezielt zum Wirkort. Wenn eine systemische Applikation zu Arzneimittelkonzentrationen unterhalb der therapeutischen Wirksamkeit in der Lunge führt, könnte eine inhalative Darreichung bereits bei niedriger Dosierung die gewünschten höheren Konzentrationen am Wirkort hervorrufen. Aufgrund der großen Resorptionsfläche der Lunge sind eine höhere Bioverfügbarkeit und ein schnellerer Wirkungseintritt infolge des fehlenden *First-Pass*-Effektes möglich. Es kommt ebenfalls zu minimalen systemischen Nebenwirkungen. Die elektronische Zigarette erzeugt wie die medizinischen Inhalatoren lungengängige Partikel. Die atemzuggesteuerte Technik ermöglicht eine unkomplizierte und intuitive Anwendung. Der prinzipielle Aufbau besteht aus einer elektrisch beheizten Wendel und einem Akku. Die Heizwendel ist von einem sogenannten Liquid in einem Tank umgeben und erzeugt das Aerosol. Das Liquid beinhaltet eine Basismischung bestehend aus Propylenglycol, Glycerin und reinem Wasser in unterschiedlichen prozentualen Anteilen. Es besteht die Annahme, dass das Basisliquid auch mit pharmazeutischen Wirkstoffen für die pulmonale

Applikation beladen werden kann. Aufgrund der thermischen Belastung durch die e-Zigarette müssen potentielle Wirkstoffe sowie das Vehikel eine thermische Stabilität aufweisen.

Die potentielle medizinische Anwendung der Technologie einer handelsüblichen e-Zigarette wurde anhand von drei Schwerpunkten an vier Wirkstoffen untersucht. Die drei ätherischen Öle Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl wurden aufgrund ihrer leichten Flüchtigkeit und der historischen pharmazeutischen Anwendung anhand von Inhalationen bei Erkältungssymptomen bzw. im zahnmedizinischen Bereich gewählt. Das eingesetzte Cannabinoid Cannabidiol (CBD) hat einen aktuellen Bezug zu dem pharmazeutischen Markt Deutschlands zur Legalisierung von cannabishaltigen Produkten und der medizinischen Forschung zum inhalativen Konsum. Es wurden relevante wirkstoffhaltige Flüssigformulierungen entwickelt und hinsichtlich ihrer Verdampfbarkeit zu Aerosolen bewertet. In den quantitativen und qualitativen chromatographischen Untersuchungen konnten spezifische Verdampfungsprofile der Wirkstoffe erfasst und bewertet werden. Dabei stieg die verdampfte Masse der Leitsubstanzen 1,8-Cineol (Eucalyptusöl), Menthol (Minzöl) und Eugenol (Nelkenöl) zwischen 33,6 µg und 156,2 µg pro Zug proportional zur Konzentration im Liquid im Bereich zwischen 0,5% und 1,5% bei einer Leistung von 20 Watt. Die Freisetzungsrate von Cannabidiol hingegen schien unabhängig von der Konzentration im Liquid im Mittelwert bei 13,3 µg pro Zug zu liegen. Dieses konnte an fünf CBD-haltigen Liquids im Konzentrationsbereich zwischen 31 µg/g und 5120 µg/g Liquid gezeigt werden. Außerdem konnte eine Steigerung der verdampften Massen mit Zunahme der Leistung der e-Zigarette festgestellt werden. Die Interaktion der Liquids bzw. Aerosole mit den Bestandteilen des Speichels sowie weiterer gastrointestinaler Flüssigkeiten wurde über die Anwendung von zugehörigen *in vitro* Modellen und Einsatz von Enzymaktivitäts-Assays geprüft. In den Untersuchungen wurden Änderungen von Enzymaktivitäten anhand des oralen Schlüsselenzyms  $\alpha$ -Amylase sowie von Proteasen ermittelt. Damit sollte exemplarisch ein möglicher Einfluss auf physiologische bzw. metabolische Prozesse im humanen Organismus geprüft werden. Das Bedampfen von biologischen Suspensionen führte bei niedriger Leistung der e-Zigarette (20 Watt) zu keiner bzw. einer leichten Änderung der Enzymaktivität. Die Anwendung einer hohen Leistung (80 Watt) bewirkte tendenziell das Herabsetzen der Enzymaktivitäten. Die Erhöhung der Enzymaktivitäten könnte zu einem enzymatischen Abbau von Schleimstoffen wie Mucinen führen, was wiederum die effektive, mechanische Abwehr gegenüber bakteriellen Infektionen zur Folge hätte. Da eine Anwendung der Applikation insbesondere bei bakteriellen Atemwegserkrankungen denkbar wäre, folgten abschließend Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro*. Es wurden sechs klinisch relevante bakterielle Krankheitserreger ausgewählt, die nach zwei Charakteristika gruppiert werden können. Die drei multiresistenten Bakterien *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* können mithilfe von üblichen Therapien mit Antibiotika nicht abgetötet werden und haben vor allem eine nosokomiale

Relevanz. Die zweite Gruppe weist Eigenschaften auf, die vordergründig assoziiert sind mit respiratorischen Erkrankungen. Die Bakterien *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* sind repräsentativ beteiligt an Atemwegserkrankungen mit diverser Symptomatik. Die Bakterienarten wurden mit den jeweiligen Liquids behandelt bzw. bedampft und deren grundlegende Dosis-Wirkungsbeziehung charakterisiert. Dabei konnte eine antibakterielle Aktivität der Formulierungen ermittelt werden, die durch Zugabe eines Wirkstoffes die bereits antibakterielle Wirkung der Bestandteile Glycerin und Propylenglycol verstärkte. Die hygroskopischen Eigenschaften dieser Substanzen sind vermutlich für eine Wirkung in aerosolierter Form verantwortlich. Sie entziehen die Feuchtigkeit aus der Luft und haben einen austrocknenden Effekt auf die Bakterien. Das Bedampfen der Bakterienarten *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* hatte einen antibakteriellen Effekt, der zeitlich abhängig von der Leistung der e-Zigarette war.

Die Ergebnisse der Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass jeder Wirkstoff bzw. jede Substanzklasse individuell zu bewerten ist und somit Inhalator und Formulierung aufeinander abgestimmt werden müssen. Der Einsatz der e-Zigarette als Medizinprodukt zur Applikation von Arzneimitteln setzt stets Prüfungen nach Europäischem Arzneibuch voraus. Durch Modifizierungen könnte eine Dosierung gut kontrollierbar gemacht werden, aber auch die Partikelgrößenverteilung kann insoweit reguliert werden, dass die Wirkstoffe je nach Partikelgröße zu einem geeigneten Applikationsort wie Mund, Rachen oder Bronchien transportiert werden. Der Vergleich mit den Eigenschaften anderer medizinischer Inhalatoren führt zu dem Schluss, dass die Technologie der e-Zigarette durchaus eine gleichartige oder bessere Performance für thermisch stabile Wirkstoffe bieten könnte. Dieses fiktive Medizinprodukt könnte aus einer hersteller-unspezifisch produzierten, wieder aufladbaren Energiequelle mit Universalgewinde zum mehrfachen Gebrauch und einer hersteller- und wirkstoffspezifisch produzierten Einheit aus Verdampfer und Arzneimittel bestehen. Das Arzneimittel, ein medizinisches Liquid (Vehikel und Wirkstoff) kann in dem Tank des Verdampfers mit konstanten, nicht variablen Parametern patientenindividuell produziert werden. Inhalative Anwendungen werden perspektivisch wohl nicht zuletzt aufgrund der aktuellen COVID-19-Pandemie eine zunehmende Rolle spielen. Der Bedarf nach alternativen Therapieoptionen wird weiter ansteigen. Diese Arbeit liefert einen Beitrag zum Einsatz der Technologie der elektronischen Zigarette als *electronic nicotine delivery system* (ENDS) nach Modifizierung zu einem potentiellen pulmonalen Applikationssystem als *electronic drug delivery system* (EDDS) von inhalativen, thermisch stabilen Arzneimitteln in Form eines Medizinproduktes.

## Summary

Respiratory diseases increasingly represent a globally relevant problem. The extension or modification of application routes of possible drugs for targeted topical applications is thereby of utmost importance. The variation of a known application route through different technological implementations can increase the diversity of application possibilities, but also patient compliance. Simple and flexible procedures through rapid availability and a convenient technology are nowadays important characteristics in the development process of a product. Direct topical treatment of respiratory diseases at the site of action in form of inhaled application offers many advantages over systemic therapy. However, medical inhalation of active substances via lung is a complex challenge. Inhalers are one of the forms of application that require explanation and must be made as simple as possible to increase consistent adherence to the prescription. In parallel, approximately 68 million people worldwide own and use the technology of an inhaler to deliberately harm their health in form of an electronic cigarette. This well-known application offers the potential possibility of an available, cost-effective and quality-assured health measure to control, prevent and cure respiratory diseases. It produces an aerosol by electro-thermal heating of a so-called liquid, which reaches a heating element through capillary forces of a carrier material and vaporizes. Its popularity indicates that an intended effect occurs in the respiratory tract. However, this effect could also be transferable to potential pharmaceutical applications. The advantages of pulmonary administration are manifold. Compared to peroral application, the active ingredient reaches the site of action in a targeted manner. If systemic application results to drug concentrations below the therapeutic efficacy in the lung, inhalation could produce the desired higher concentrations at the site of action even at low doses. Due to the large absorption surface of the lungs, a higher bioavailability and a faster onset of action is possible as a result of the lack of first-pass effect. There are also minimal systemic side effects. Like medical inhalers, the electronic cigarette produces respirable particles. The breath-controlled technology enables uncomplicated and intuitive use. The basic construction consists of an electrically heated coil and a rechargeable battery. The heating coil is surrounded by a so-called liquid in a tank and generates the aerosol. The liquid contains a base mixture consisting of propylene glycol, glycerine and pure water in varying percentages. It is assumed that the base liquid can also be loaded with active pharmaceutical ingredients for pulmonary application. Due to thermal load of the e-cigarette, potential active ingredients as well as vehicles must exhibit thermal stability.

The potential medical application of the technology of a commercially available e-cigarette was investigated on the basis of three focal investigations for four active ingredients. The three essential oils eucalyptus oil, mint oil and clove oil were chosen due to their light volatility and the historical

pharmaceutical application based on inhalations for cold symptoms or in the dental field, respectively. The choice of the cannabinoid cannabidiol (CBD) used is currently related to the pharmaceutical market situation in Germany while considering the legalization of cannabis-containing products and medical research on inhaled consumption. Relevant liquid formulations containing active ingredients were developed and evaluated with regard to their evaporability to aerosols. In quantitative and qualitative chromatographic investigations, specific vaporization profiles of the active substances were recorded and evaluated. The evaporated mass of analytical markers 1,8-cineole (eucalyptus oil), menthol (mint oil) and eugenol (clove oil) increased between 33.6 µg and 156.2 µg per puff proportional to the concentration in liquids in the range between 0.5% and 1.5% at a power application of 20 watts. The release rate of cannabidiol, on the other hand, appeared to average 13.3 µg per puff regardless of the concentration in the liquid. This was demonstrated on five CBD-containing liquids in the concentration range between 31 µg/g and 5120 µg/g liquid. In addition, an increased vaporized mass with increased power of e-cigarette could be observed. The interaction of the liquids or aerosols with the components of saliva and other gastrointestinal fluids was tested by application of associated *in vitro* models and the use of enzyme activity assays. In the studies, changes in enzyme activities were determined using the key oral enzyme  $\alpha$ -amylase as well as proteases. The aim was to test a possible influence on physiological or metabolic processes in the human organism as an example. Treatment of biological suspensions with aerosol resulted in no or a slight change in enzyme activity at low power of e-cigarette (20 watts). The application of high power (80 watts) tended to decrease enzyme activities. The increase in enzyme activities could lead to enzymatic degradation of mucins, which in turn could reduce effective mechanical defense against bacterial infections. Since an application would be conceivable in particular for bacterial respiratory diseases, concluding investigations of the antibacterial properties of the liquids or aerosols *in vitro* followed. Six clinically relevant bacterial pathogens were selected, which can be grouped according to two characteristics. The three multi-resistant bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cannot be killed by standard antibiotic therapies and are primarily of nosocomial relevance. The second group exhibits characteristics that are mainly associated with respiratory diseases. The bacteria *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* are representatively involved in respiratory diseases with diverse symptoms. These bacterial species were treated with the respective liquids or aerosols and their basic dose-response relationship was characterized. Antibacterial activity of formulations could be determined, which enhanced the already antimicrobial effect of the vehicle components glycerine and propylene glycol by addition of active pharmaceutical ingredients. The hygroscopic properties of these substances are probably responsible for an effect in aerosolized form. They remove moisture from air and have a desiccating effect on bacteria. The treatment of bacterial species *Streptococcus pneumoniae*,

*Moraxella catarrhalis* and *Haemophilus influenzae* with aerosol had an antibacterial effect that was time-dependent on the applied power of e-cigarette.

The results of investigations lead to the conclusion that each active pharmaceutical ingredient or substance class must be evaluated individually and thus inhaler and formulation must be matched to each other. The use of e-cigarette as a medical device for the application of medicinal products would definitely requires tests according to the European Pharmacopoeia. Modifications could make a dosage well controllable, but also the particle size distribution can be regulated to the extent that the active ingredients are transported to a suitable application site such as mouth, throat or bronchi depending on the particle size. The comparison with properties of other medical inhalers leads to the conclusion that the technology of e-cigarette could well offer similar or better performance for thermally stable active ingredients. This fictitious medical device could consist of a manufacturer-unspecifically produced, rechargeable energy source with a universal thread for multiple use and a manufacturer- and active substance-specifically produced unit consisting of vaporizer and personalized drug content. The drug, a medical liquid (vehicle and active ingredient) can be produced in the tank of the vaporizer with constant, non-variable parameters specific to the patient. Inhaled applications will probably play an increasing role in the future, not least because of the current COVID-19 pandemic. The need for alternative therapeutic options will continue to increase. This work provides a contribution to the use of electronic nicotine delivery system (ENDS) after modification to a potential pulmonary application system as an electronic drug delivery system (EDDS) of inhaled, thermally stable drugs in form of a medical device.

## Abkürzungen und Symbole

ADI	<i>acceptable daily intake</i>	mAIF	<i>modified artificial intestine fluid</i>
AG	Arbeitsgruppe	MBK	minimale bakterizide Konzentration
AHS	<i>artificial human saliva</i>	MDI	<i>metered dose inhaler</i>
AK	Akzeptanzkriterium	MHK	minimale Hemmkonzentration
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>	MHK <sub>vol</sub>	minimale volatile Hemmkonzentration
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>	ML	Minzöl-Liquid
AUC	<i>Area under the Curve</i>	MMAD	<i>mass median aerodynamic diameter</i>
AZ	Analysenzertifikat	MÖ	Minzöl
B	Basisliquid	MPG	Medizinproduktegesetz
BCS	<i>Biopharmaceutics Classification System</i>	MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
BD	<i>Blue Dream</i>	MTL	<i>mouth to lung</i>
BS	Bakteriensuspension	NAD	Nicotinamadenindinukleotid
CB	Cannabinoid	ndec	nicht decarboxyliert
CBD	Cannabidiol	NEG	Negativkontrolle
CBDa	Cannabidiolsäure	NFDPM	<i>nicotine-free dry particulate matter</i>
CE	<i>Conformité Européenne</i>	NF-κB	Nukleärer Faktor κB
CF	<i>cystic fibrosis</i>	NL	Nelkenöl-Liquid
CL	Cannabidiol-Liquid	NÖ	Nelkenöl
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	NRZ	Nationales Referenzzentrum
CMR	<i>carcinogenic, mutagenic and toxic to reproduction</i>	Ø	Durchmesser
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i>	OLED	<i>organic light-emitting diode</i>
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>	P.a.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
dec	decarboxyliert	PG	Propylenglycol
DPI	<i>dry powder inhaler</i>	Pharm. Eur.	Europäisches Arzneibuch
DTL	<i>direct to lung</i>	PM	<i>particulate matter</i>
EDDS	<i>electronic drug delivery system</i>	pMDI	<i>pressurized metered dose inhaler</i>
EL	Eucalyptusöl-Liquid	POS	Positivkontrolle
ENDS	<i>electronic nicotin delivery system</i>	PVC	Polyvinylchlorid
EÖ	Eucalyptusöl	RBA	<i>rebuildable atomizer</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>	RP	<i>reversed phase</i>
e-Zigarette	elektronische Zigarette	S.p.	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
F	Flachboden	SK	Sterilkontrolle
FCKW	Fluorchlorkohlenwasserstoffe	T	Tobramycin
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>	TDLo	geringste bekannte toxische Dosis
FID	Flammenionisationsdetektor	THC	Tetrahydrocannabinol
GC	<i>gas chromatography</i>	TL	Tobramycin-Liquid
GRAS	<i>generally recognized as safe</i>	TPM	<i>total particulate matter</i>
H.i.	<i>Haemophilus influenzae</i>	TRPM8	<i>transient receptor potential Melastin 8</i>
HFA	Hydrofluoralkane	USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>	VE	vollständig entsalzen
HS	<i>human saliva</i>	VK	Variationskoeffizient
IPP	Isopentenylpyrophosphat	VP	Verdampfungsprotokoll
ISO	Internationale Organisation für Normung	VW	<i>variable wattage</i>
K	Kontrolle	ZLG	Zentralstelle der Länder für Gesundheitschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten
K.p.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
KBE	koloniebildende Einheiten		
LC	<i>liquid chromatography</i>		
LD <sub>50</sub>	mittlere letale Dosis		
LOD	<i>Limit of Detection</i>		
LOQ	<i>Limit of Quantification</i>		
M.c.	<i>Moraxella catarrhalis</i>		

# Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Das Bronchialsystem als symmetrischer Baum nach Weibel und Gomez .....	23
Abbildung 2	Pulmonaler Gasaustausch und Arterialisierung.....	24
Abbildung 3	Arten und Größenbereiche von Beispiel-Partikeln.....	25
Abbildung 4	Deposition eines Aerosolpartikels in der Lunge.....	26
Abbildung 5	Medizinische Inhalatoren zur Applikation von Arzneimitteln.....	32
Abbildung 6	Prozentuelle Verteilung der Wirkstoffdeposition aus Inhalatoren der 1980er Jahre .....	34
Abbildung 7	Die vier Generationen der e-Zigarette.....	38
Abbildung 8	Isoprenregel nach Wallach .....	45
Abbildung 9	Biosynthese von sekundären Metaboliten.....	47
Abbildung 10	Biosynthese von Terpenoiden.....	48
Abbildung 11	Biosynthese von 1,8-Cineol.....	49
Abbildung 12	Biosynthese von (-)-Menthol.....	49
Abbildung 13	Biosynthese von Eugenol.....	50
Abbildung 14	Biosynthese von Cannabidiolsäure.....	53
Abbildung 15	Decarboxylierung von Cannabidiolsäure (CBDA) zu Cannabidiol (CBD).....	53
Abbildung 16	Cannabisblütensorten für den Einsatz zur Herstellung von Liquids.....	62
Abbildung 17	Elektronische Zigarette „Cuboid Mini“ der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd.....	64
Abbildung 18	Bauteile des Clearomizers „Aspire Cleito“ der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd.....	65
Abbildung 19	Clearomizer "Aspire Cleito" der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd.....	66
Abbildung 20	Konstruktion zum standardisierten Verdampfen von Liquids mithilfe der e-Zigarette und Probenahme von Aerosolen.....	67
Abbildung 21	Chromatographische Trennung eines Stoffgemisches aufgrund von unterschiedlicher Retention während des Transportes durch die stationäre Phase.....	69
Abbildung 22	Schematischer Aufbau eines gaschromatographischen Systems.....	71
Abbildung 23	Schematischer Aufbau eines flüssigchromatographischen Systems.....	72
Abbildung 24	Pipettierschema der Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der Modellsubstanzen mit dem Mikrodilutionsverfahren nach CLSI.....	83
Abbildung 25	Schematischer Aufbau der Gas-Kontakt-Methode im Querschnitt.....	85
Abbildung 26	Schematischer Aufbau der Sättigungsbox im Querschnitt.....	86
Abbildung 27	Chromatographische Darstellung der ätherischen Öle und ihrer Leitsubstanzen.....	89

Abbildung 28	Ergebnisse der gaschromatographischen Verdampfungsuntersuchungen der Leitsubstanzen in Aerosolen nach Verdampfungsprotokoll.....	91
Abbildung 29	Ergebnisse der Massenbestimmung der jeweiligen Liquids in Aerosolen nach Verdampfungsprotokoll.....	93
Abbildung 30	Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Leistung der e-Zigarette auf das Verdampfungsverhalten von 1,8-Cineol.....	95
Abbildung 31	Chromatographische Darstellung von Cannabidiol und des Cannabis-Extraktes BD-L (dec).....	96
Abbildung 32	Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung der CBD-haltigen Liquids hergestellt aus pflanzlichem Material (Antal-L und BD-L) bzw. der reinen Substanz (CL).....	99
Abbildung 33	Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung (A) und Massenbestimmung (B) der CBD-haltigen Liquids hergestellt aus pflanzlichem Material (Antal-L und BD-L) bzw. der reinen Substanz (CL).....	100
Abbildung 34	Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Leistung der e-Zigarette auf das Verdampfungsverhalten des Cannabidiol-Liquids (CL).....	101
Abbildung 35	Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Anzahl der Züge auf das Verdampfungsverhalten des Cannabidiol-Liquids (CL) bei 20 Watt.....	102
Abbildung 36	Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach direkter Inkubation.....	108
Abbildung 37	Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Basisliquid (B).....	109
Abbildung 38	Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Eucalyptusöl-Liquid (EL).....	110
Abbildung 39	Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Minzöl-Liquid (ML).....	111
Abbildung 40	Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Nelkenöl-Liquid (NL).....	112
Abbildung 41	Logarithmische Darstellung der MHK-Werte der Modellsubstanzen mithilfe von Mikrodilution für sechs Bakterienarten.....	118
Abbildung 42	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 289 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	123
Abbildung 43	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an <i>Klebsiella pneumoniae</i> 245 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	124
Abbildung 44	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an MRSA 29 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	125
Abbildung 45	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an <i>Streptococcus pneumoniae</i> 351 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	126

Abbildung 46	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an <i>Moraxella catarrhalis</i> 258 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	127
Abbildung 47	Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an <i>Haemophilus influenzae</i> 361 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK).....	128
Abbildung 48	Untersuchung der Inhibierung anhand der Gas-Kontakt-Methode am Beispiel Minzöl gegenüber MRSA.....	131
Abbildung 49	Untersuchung der Inhibierung anhand der Methode der Sättigungsbox am Beispiel MRSA.....	134
Abbildung 50	Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsubstanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Cannabidiol-Liquid gegenüber <i>Streptococcus pneumoniae</i> 351.....	138
Abbildung 51	Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsubstanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Minzöl-Liquid gegenüber <i>Haemophilus influenzae</i> 361.....	139
Abbildung 52	Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsubstanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Cannabidiol-Liquid gegenüber <i>Moraxella catarrhalis</i> 258.....	140

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakterisierung der untersuchten Modellsubstanzen nach Europäischem Arzneibuch.....	60
Tabelle 2	Charakterisierung des Basisliquids als Vehikel für die Modellsubstanzen.....	61
Tabelle 3	Zusammensetzung der Liquids.....	61
Tabelle 4	Herstellung der Extrakte und Liquids aus den zwei Cannabisblütensorten „Blue Dream“ und „Antal“ .....	63
Tabelle 5	Standardisiertes Verdampfungsprotokoll mit definierten Parametern und Variablen.....	68
Tabelle 6	Kalibrierungen der externen Standards für die Analyse der Leitsubstanzen.....	73
Tabelle 7	Gaschromatographische Methode für die quantitative Analytik der Leitsubstanzen der ätherischen Öle mithilfe des Hewlett Packard 5890 Series II GC-Systems.....	73
Tabelle 8	Herstellung der Liquids mit ätherischen Ölen zur gaschromatographischer Untersuchung (GC).....	74
Tabelle 9	Kalibrierung des externen Standards für die Analyse von Cannabidiol.....	74
Tabelle 10	Flüssigchromatographische Methode für die Analytik von Cannabidiol mithilfe des Hewlett Packard 1050 RP-HPLC-Systems.....	75
Tabelle 11	Biologische Suspensionen zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymen <i>in vitro</i> .....	76
Tabelle 12	Verdampfungsprotokolle zur Variation der Parameter der Erzeugung von Aerosolen.....	76
Tabelle 13	Charakterisierung der untersuchten sechs Bakterienarten.....	80
Tabelle 14	Ergebnisse der Linearität und Nachweis-(LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol der ätherischen Öle.....	88
Tabelle 15	Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchung der Leitsubstanzen in den Liquids.....	90
Tabelle 16	Thermodynamische Charakterisierung der Leitsubstanzen.....	92
Tabelle 17	Ergebnisse der Linearität und Nachweis-(LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) von Cannabidiol.....	96
Tabelle 18	Ergebnisse der chromatographischen Analyse der CBD-haltigen Rohdrogen.....	97
Tabelle 19	Ergebnisse der chromatographischen Analyse der Herstellungsschritte CBD-haltiger Liquids.....	98
Tabelle 20	Verdampfungsprotokolle zur Variation der Parameter der Erzeugung von Aerosolen.....	107
Tabelle 21	Ergebnisse der Untersuchung der Inhibierungszone mithilfe von Agardiffusion mit 30 µg der Modellsubstanzen für sechs Bakterienarten.....	114
Tabelle 22	Ergebnisse der Untersuchung der minimalen Hemmkonzentrationen der Modellsubstanzen mithilfe von Mikrodilution für sechs Bakterienarten.....	117

Tabelle 23	Vergleich der Ergebnisse der antibakteriellen Wirkung der Modellsubstanzen mithilfe von Agardiffusion (Inhibierungszone [mm], n = 3) und Mikrodilution (MHK [g/L], n = 7) gegenüber sechs Bakterienarten.....	121
Tabelle 24	Ergebnisse der minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) der Modellsubstanzen gegenüber sechs Bakterienarten nach der Time-Kill-Methode.....	129
Tabelle 25	Untersuchung der minimalen volatilen Hemmkonzentration mit vollständiger Inhibierung (MHK <sub>vol</sub> ) anhand der Gas-Kontakt-Methode gegenüber sechs Bakterienarten.....	132
Tabelle 26	Vergleich der Ergebnisse der Agardiffusion (Inhibierungszone Ø [mm], n = 3), der Mikrodilution (MHK [g/L], n = 7) und der Gas-Kontakt-Methode (MHK <sub>vol</sub> [g/L], n = 3).....	133
Tabelle 27	Untersuchung der vollständigen Inhibierung anhand der Methode der Sättigungsbox.....	135
Tabelle 28	Vergleich der Ergebnisse Sättigungsbox (X, n = 3) und der Gas-Kontakt-Methode (MHK <sub>vol</sub> [g/L], n = 3).....	135
Tabelle 29	Untersuchungsschema der Aerosol-Untersuchungen an ausgewählten Bakterienarten mit ausgewählten Modellsubstanzen und der Leistung der e-Zigarette.....	137
Tabelle 30	Zusammensetzung und Herstellung der untersuchten wirkstoffhaltigen Liquids.....	178
Tabelle 31	Zusammensetzung und Herstellung der biologischen Suspensionen zur Untersuchung der Liquids und Aerosole mithilfe von Enzymaktivitäts-Assays.....	178
Tabelle 32	Zusammensetzung und Herstellung der Reagenzien zur Untersuchung der Liquids und Aerosole anhand des α-Amylase-Assays.....	179
Tabelle 33	Zusammensetzung und Herstellung der Reagenzien zur Untersuchung der Liquids und Aerosole anhand des Protease-Assays.....	179
Tabelle 34	Zusammensetzung und Herstellung der flüssigen Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen.....	180
Tabelle 35	Ergebnisse der Validierung der chromatographischen Methoden.....	181

# 1. Einleitung

In einer Zeit, in der respiratorische Erkrankungen immer mehr an Relevanz gewinnen, ist die Erweiterung bzw. Modifizierung von Applikationswegen möglicher Arzneimittel für gezielte topische Anwendungen von größter Bedeutung. Dabei spielt die Galenik als Transformation biologisch aktiver Wirkstoffe in Arzneimitteln eine wichtige Rolle. Die Variation eines Applikationsweges durch unterschiedliche technologische Umsetzung erhöht dabei die Vielfalt der Anwendungsmöglichkeiten, aber auch die Patienten-Compliance. Die einfache und flexible Anwendung ist für den Verbraucher dabei entscheidend. Eine schnelle Verfügbarkeit und eine handliche Technologie der Applikation sind heutzutage wichtige Eigenschaften, die im Entwicklungsprozess eines Produktes eingeplant werden müssen. Die Kontrolle, Prävention und Heilung von respiratorischen Erkrankungen gehören zu den wichtigsten und kosteneffektivsten Gesundheitsmaßnahmen (1). Eine direkte topische Behandlung von Atemwegserkrankungen am Wirkort in Form einer inhalativen Applikation bietet dabei viele Vorteile gegenüber einer systemischen Therapie. Die medizinische Inhalation von Wirkstoffen über die Lunge ist jedoch eine komplexe Herausforderung. Die Handhabung ist meist individuell und muss modellspezifisch veranschaulicht werden. Inhalatoren gehören zu den erklärungsbedürftigen Applikationsformen, die zur Erhöhung der konsequenten Einhaltung der Verordnung so einfach, wie möglich gestaltet werden müssen (2). Parallel besitzen und nutzen weltweit annähernd 68 Millionen Menschen die Technologie eines inhalativen Applikators zur bewussten Schädigung ihrer Gesundheit in Form einer elektronischen Zigarette (3). In Deutschland konsumieren derzeit schätzungsweise 2,45 Millionen Menschen Aerosole mithilfe dieser Inhalationstechnologie im nicht pharmazeutischen Bereich (4). Diese bekannte Anwendung bietet die potentielle Möglichkeit einer verfügbaren, kostengünstigen und qualitätsgeprüften Gesundheitsmaßnahme zur Kontrolle, Prävention und Heilung von Atemwegserkrankungen. Sie erzeugt ein Aerosol durch elektrothermische Erwärmung eines sogenannten Liquids, das durch Kapillarkräfte eines Trägermaterials an ein Heizelement gelangt und verdampft. Die Technologie einer elektronischen Zigarette wird überwiegend als *electronic nicotine delivery system* (ENDS) zur Applikation des Sucht- und Genussmittels Nicotin und als Alternative zur Verbrennungszigarette verwendet. Das Aerosol entsteht durch die Feinverteilung der Flüssigkeit und nicht durch die Verbrennung von Pflanzenmaterial, wie beim Rauchen einer brennbaren Tabakzigarette (5). Ihr Bekanntheitsgrad zeigt, dass die beabsichtigte Wirkung in den Atemwegen eintritt. Diese Wirkung könnte aber auch übertragbar sein auf potentielle pharmazeutische Einsatzgebiete. Es stellt sich die Frage, ob die Modifizierung von bestehenden Technologien und deren Anwendung zur Applikation von Arzneimitteln mit einem positiven Nutzen für die Gesundheit möglich ist. Dieser pharmazeutische Ansatz wurde bislang noch nicht verfolgt. Die Entwicklung inhalierbarer

Arzneimittel ist eine anspruchsvolle wissenschaftliche Forschungsaufgabe. Die unterschiedlichen anatomischen, physiologischen und immunologischen Barrieren beeinflussen die therapeutische Wirksamkeit von inhalativen Formulierungen. Diese besondere Art der Galenik setzt toxikologische Studien und Unbedenklichkeitsprüfungen voraus, die nicht verallgemeinernd mit anderen Applikationswegen verglichen werden können. Eine erfolgreiche Anwendung erfordert nicht nur eine geeignete Formulierung, sondern auch ein kompatibles Inhalationsgerät zur Erzeugung von therapeutischen Aerosolen. Die Wahl des Inhalators hängt vom therapeutischen Ziel und von der Substanzklasse des Arzneistoffes ab. Die zugelassenen Technologien umfassen die drei Kategorien: Dosierinhalatoren (*metered dose inhaler*, MDI), Pulverinhalatoren (*dry powder inhaler*, DPI) und Vernebler (*nebulizer*). Die drei Technologien erzeugen Aerosole, die abhängig von ihrer Partikelgröße unterschiedliche Bereiche der Lunge erreichen und sowohl topisch als auch systemisch wirken können (6). Die Vorteile der inhalativen Applikation sind dabei vielfältig. Im Vergleich zur peroralen Applikation gelangt der Wirkstoff direkt zum Wirkort. Wenn eine systemische Applikation zu Konzentrationen unterhalb der therapeutischen Wirksamkeit in der Lunge führt, kann eine Inhalation höhere Konzentrationen am Wirkort bei niedriger Dosierung erreichen. Die pulmonale Applikation kann aufgrund der großen Resorptionsfläche der Lunge eine höhere Bioverfügbarkeit und einen schnelleren Wirkungseintritt bewirken. Die meisten inhalativen Anwendungen sind verbunden mit einer Hypersekretion, mit Entzündungen und Ödemen und mit Spasmen der Bronchialmuskulatur. Die Therapien beruhen dabei vordergründig auf der Behandlung der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD), Asthma bronchiale, Mukoviszidose und akuten Infektionen der unteren Atemwege. Die elektronische Zigarette erzeugt wie die medizinischen Inhalatoren lungengängige Partikel. Die atemzuggesteuerte Technik ermöglicht eine unkomplizierte und intuitive Anwendung. Der prinzipielle Aufbau besteht aus einer elektrisch beheizten Wendel, die ein Aerosol erzeugt, und einem Akku. Die Heizwendel ist von einem sogenannten Liquid in einem Tank umgeben. Das Liquid beinhaltet eine Basismischung bestehend aus Propylenglycol, Glycerin und reinem Wasser in unterschiedlichen prozentualen Anteilen. Dieses Basisliquid dient demnach als Vehikel zum Transport von Substanzen wie Nicotin und Aromen und ist im Tabakerzeugungsgesetz geregelt. Es gibt Hinweise darauf, dass eine akute Exposition gegenüber Aerosolen aus zusatzfreiem Basisliquid möglicherweise keine signifikanten Veränderungen der Lungenfunktion verursacht (7), wohingegen eine chronische Exposition zu einer Beeinträchtigung der Lungenfunktion führen könnte (8). Bei der Zugabe von Nicotin und vor allem Aromen kann es zu weiteren negativen gesundheitlichen Auswirkungen kommen deren Ursprung schwierig nachvollziehbar ist, da die genauen Inhaltsstoffe nicht eindeutig deklariert werden. Die Hersteller verweisen nur auf den Einsatz von zugelassenen Aromen nach dem Lebensmittelrecht. Dies zeigt die Wichtigkeit von kontrollierten zugelassenen Substanzen für die pulmonale Applikation, wie sie im

Arzneimittelrecht gegeben ist. Es besteht die Annahme, dass das Basisliquid auch mit pharmazeutischen Wirkstoffen für die pulmonale Applikation beladen werden kann. Aufgrund der thermischen Belastung durch die e-Zigarette müssen potentielle Wirkstoffe sowie das Vehikel eine thermische Stabilität aufweisen. Der Metabolismus von inhalierten organischen Verbindungen nach Deposition hängt von der Partikelgröße, der Löslichkeit in Körperflüssigkeiten und der Konzentration ab. Die inhalierten Partikel deponieren abhängig von ihrer Größe aufgrund von Impaktion, Sedimentation oder Diffusion in verschiedenen Bereichen der Atemwege. Die Löslichkeit von kleinen lipophilen Molekülen ist in den unteren Atemwegen höher, wohingegen hydrophile Moleküle in den oberen Atemwegen schneller absorbiert werden. Je höher die Dosierung, desto größer ist der Anteil, der nicht metabolisiert aufgrund von Clearance-Mechanismen ausgeschieden wird (9). Die pharmakokinetischen Prozesse, die nach pulmonaler Applikation erfolgen, sind aufgrund der Komplexität der einzelnen Bereiche der Lunge sehr spezifisch. Die Entwicklung von neuen Applikationstechnologien hängt stark von diesen Prozessen und dem Sicherheitsprofil potentieller Wirkstoffe ab. Die positiven aber auch negativen Effekte auf den menschlichen Organismus dieser potentiellen inhalativen Technologie gilt es aufzuklären und die Vorteile gegenüber anderen medizinischen Inhalatoren auszuarbeiten.

## 2. Theoretischer Hintergrund

### 2.1 Inhalation

Die Inhalation (lat. *inhalare* - „anhauchen“) ist eine topische Applikationsform zur medizinischen Therapie, bei der durch Einatmen Wirkstoffe in Form eines Aerosols über die Luftröhre die Lunge erreichen können. Neben der lokalen Wirkung, wie der Modulation der bronchialen Muskulatur oder der Konsistenz des Bronchialsekrets, können auch systemische Effekte induziert werden, wie bei Inhalationsnarkotika.

Ein Aerosol ist eine Dispersion aus einer festen (Staubaerosol) und/oder flüssigen (Nebelaerosol) dispergierten Phase, auch Schwebstoff genannt, in einem gasförmigen Dispersionsmittel. Das Einwirken der Schwerkraft führt zu einer Entmischung des Aerosols. Der heutige Stand der Wissenschaft, aber auch der Stand der Technik hat zu einem breiten Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten für Aerosole geführt. Die ubiquitäre kommerzielle Verbreitung von Aerosolen ist Bestandteil beispielsweise in der Kosmetik (Parfüm, Deodorant), im Haushalt (Reinigungsmittel) und in der Technik (Lackierungen). Aerosole können aber auch auf natürlichem Wege, wie durch Pollenflug oder durch anthropogene Emissionen, wie verkehrsbedingte Feinstäube oder Brandrodungen entstehen. Beide Beispiele für schädliche Aerosole verursachen wiederum eine Belastung des humanen Organismus und können u.a. Erkrankungen der Atemwege begünstigen (10). Aufgrund dessen wurde die berufliche und umweltbedingte Exposition von Aerosolen in den menschlichen Atemwegen in den letzten 50 Jahren hauptsächlich zur Bewertung von Grenzwerten an Arbeitsplätzen untersucht. Die Einführung einer PM-Kategorisierung (*particulate matter*) im Jahr 1987 fokussierte den inhalierbaren Anteil von Immissionen nach Feinstaubgrößen. Die Aerosole mit einem aerodynamischen Durchmesser von  $<10\ \mu\text{m}$  werden als  $\text{PM}_{10}$  klassifiziert, analog werden die Klassen  $\text{PM}_{2,5}$  ( $\varnothing < 2,5\ \mu\text{m}$ ) und  $\text{PM}_1$  ( $\varnothing < 1\ \mu\text{m}$ ) deklariert (11). Die wichtigste Aufgabe bei der Entwicklung einer inhalativen Technologie ist es sicherzustellen, dass das Aerosol in die zu therapierenden Bereiche des Atemtrakts gelangt. Dabei können Wirkstoffe z.B. aufgrund ihres hohen Dampfdruckes bei Raumtemperatur verflüchtigen und somit resorbiert werden, wie bei der medizinischen Anwendung ätherischer Öle. Vorwiegend müssen sie allerdings vorab in eine inhalierbare Form gebracht werden (12). Diese technologische Umsetzung der Erzeugung und Applikation eines therapeutischen Aerosols wird in Kapitel 2.1.2 Technologien zur Inhalation näher erörtert.

Therapeutische Inhalationen wurden bereits vor über 4000 Jahren in der traditionellen indischen Alternativmedizin – der Ayurveda – beschrieben (13). Das traditionelle Wissen über die Verarbeitung von Pflanzenteilen zur medizinischen Inhalation konnte bis in die neuzeitliche Phytotherapie erhalten

bleiben. Bereits Hippokrates und Galen beschrieben die Linderung von Atemwegserkrankungen durch salzhaltige Meeresluft oder die wohltuenden ätherischen Öle in der Waldluft der heutigen Kurorte. Dieses fand ebenso Anwendung wie Räucherungen zu medizinischen Zwecken beispielsweise durch sogenannte Asthma-Zigaretten oder Quecksilberdämpfe bei Syphilis. Seit Jahrhunderten wird das Inhalieren von leicht flüchtigen Wirkstoffen aus Arzneidroge mit Hilfe von Wasserdampf praktiziert. Dabei beugt sich der Anwender zur Inhalation mit dem Gesicht über eine heiße Flüssigkeit. Ein Handtuch, über den Hinterkopf gelegt, soll eine mit Wirkstoff gesättigte Atmosphäre schaffen. Dieses sogenannte Dampfteilbad kann zur Linderung von Beschwerden der oberen Atemwege und zur Befeuchtung von Schleimhäuten beitragen. Mit dem Beginn der industriellen Revolution im Jahr 1760 führten neue Herstellungsmöglichkeiten und technische Entdeckungen zu bedeutenden Fortschritten bei der Applikation therapeutischer Aerosole (13). Die Massenproduktion von inhalativen Verabreichungssystemen ersetzte die meist individuellen Zubereitungen der Ärzte. Die formale Anerkennung der Inhalation als therapeutische Applikation von Wirkstoffen wurde 1867 durch Aufnahme in eine große Pharmakopöe erlangt. Das britische Arzneibuch listete fünf Arzneimittel zur inhalativen Anwendung auf: Blausäure, Chlor, Jod, das Teeröl Kreosot und Pflanzenteile des Schierlings. Die Inhalation dieser Stoffe ist nach heutigem Wissensstand ungeeignet und wird nicht mehr praktiziert (13). Die pharmakologische Wirkung setzt das Eindringen ausreichender Konzentrationen aerosolierter Wirkstoffe bis in die feinen Bronchialverzweigungen und Alveolen voraus. Im Jahr 1920 konnte durch experimentelle Untersuchungen die wissenschaftliche Grundlage der Inhalationstherapie geschaffen werden, indem die Tröpfchengröße zur Lungengängigkeit von Wirkstoffen definiert wurde. Die Tröpfchen sollten einen Durchmesser von 1 – 20 µm haben, um mit dem inspiratorischen Luftstrom mitgeführt und an den feuchten Bronchialwänden absorbiert zu werden (14). Ein Meilenstein in der klinischen Anwendung der medikamentösen Inhalationstherapie war die *Conference on the Scientific Basis of Respiratory Therapy* im Jahr 1974. Dort sprachen Experten der Lungenmedizin und Beatmungspflege über Untersuchungen der wissenschaftlichen Grundlagen der Beatmungspflege und speziell über die Aerosoltherapie (15). Die Unterzeichnung des Montrealer Protokolls im September 1987 veränderte die pharmazeutische Aerosolindustrie dramatisch und führte zu einem Entwicklungs- und Innovationsschub von Dosier- und Pulverinhalatoren und der Entwicklung von fortschrittlichen Verneblersystemen (16).

Heutzutage wird die inhalative Therapie hauptsächlich bei akuten und chronischen Atemwegserkrankungen eingesetzt, dabei vor allem bei Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Auch Erkrankungen wie Bronchitis, Mukoviszidose und Pneumonien werden über pulmonale Applikation von Wirkstoffen behandelt. Die gezielte Applikation von Wirkstoffen in der Lunge hat viele potentielle Vorteile. Die sehr große Oberfläche der Lunge ermöglicht eine gezielte Anwendung direkt am Wirkort und eine schnelle Absorption. Je nach

Erkrankung können unterschiedliche Bereiche der Lunge durch Regulierung der Partikelgröße erreicht werden. Aufgrund der Umgehung des *First-Pass*-Effektes ist eine geringere Dosierung notwendig und eine bessere Bioverfügbarkeit möglich. Darüber hinaus gibt es eine geringere proteolytische Enzymaktivität in der Lunge verglichen mit dem Gastrointestinaltrakt. Diese nicht invasive Applikation ermöglicht eine hohe lokale Konzentration am Zielort bei reduzierter Dosierung und Minimierung möglicher Nebenwirkungen und systemischer Exposition. Der grundsätzliche Nachteil besteht in der technologischen Ausführung, denn trotz der geeigneten Gerätekonstruktionen erreicht nur ein Bruchteil der Dosis das beabsichtigte Ziel. Der Grund für diese geringe Effizienz der Lungenablagerung liegt jedoch auch im sehr individuellen Applikationsprofil jeder Anwendung. Die pulmonale Verabreichung ist herausfordernd und hängt stark von der Atmung des Patienten, der Formulierung und der verwendeten Technologie ab. Das Inhalationsverhalten von Menschen ist sehr stark individuell und kann sich erheblich unterscheiden. Ein ideales Aerosolsystem sollte zuverlässig und reproduzierbar eine hohe Effizienz der Lungendeposition ermöglichen. Die Erzeugung von lungengängigen Aerosolen muss einfach und selbsterklärend gehandhabt werden. Die Technologie sollte widerstandsfähig gegenüber Kontamination und Verschleiß sein und die Fähigkeit zur Mehrfachdosierung haben (17).

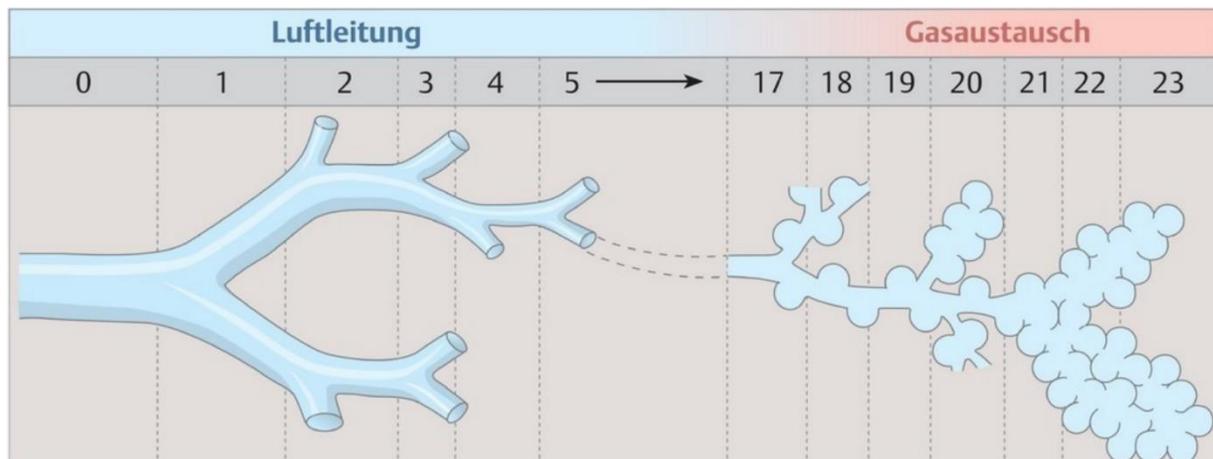
## 2.1.1 Inhalation von Wirkstoffen

### 2.1.1.1 Aufbau von Lunge und Bronchien

Der menschliche Atmungsapparat ist ein komplexes System, wobei die Lunge den funktionellen Bereich darstellt. Die Lunge sitzt im Brustraum (Thorax) und teilt sich in zwei Lungenflügel. Der Atemtrakt wird in die oberen und unteren Atemwege gegliedert. Die oberen, konduktiven Atemwege umfassen die Nasenhöhle, den Rachenraum (Pharynx) und den Kehlkopf (Larynx). Sie bilden den extrathorakalen Abschnitt. Ihre Aufgabe besteht in der Erwärmung, Befeuchtung und Reinigung der eingeatmeten Luft. Am Kehlkopf trennen sich die Luft- und Speisewege. Die unteren Atemwege bestehen aus der Luftröhre (Trachea), die sich in die Stammbronchien aufspaltet und über die Bronchien in den respiratorischen Bereich der Lunge führt. Die Bronchiolen und die darauffolgende alveolare Ebene sind für den effektiven Gasaustausch verantwortlich. Diese sogenannten Lungenbläschen werden von einem etwa 100 m<sup>2</sup> großen Kapillarnetz aus feinen Blutgefäßen umspannt (18). Die Gesamtkapazität der Lunge, auch Totvolumen genannt, kann bei Erwachsenen bis zu 6 Liter Luft betragen, wobei selbst bei maximaler Ausatmung ein Restvolumen von 1,25 Litern in den leitenden Atemwegen verbleibt. Im Ruhezustand benötigt ein Mensch 0,3 L/min O<sub>2</sub>, während

0,25 L/min CO<sub>2</sub> wieder ausgeatmet werden. Für diesen Vorgang werden annähernd 7 L/min Luft ausgetauscht (19, 20).

Das Bronchialsystem mit seinen fortschreitenden bronchialen Verzweigungen wurde im Jahr 1963 von Weibel und Gomez mit einem symmetrischen Baum verglichen (21). Das Modell des Bronchialbaumes wird in 23 Teilungsgenerationen gegliedert, die sich in ihrer Anzahl an Bronchialsegmenten exponentiell vervielfachen. Dabei bildet die Trachea (Stamm) die Generation null und teilt die erste Generation in linken und rechten Lungenflügel. Mit Zunahme der Generationen nimmt die Anzahl der Verästelungen zu, der Durchmesser der Gefäße und die Strömungsgeschwindigkeit jedoch ab. Die ersten 16 Generationen befinden sich in der leitenden Zone, der respiratorische Gasaustausch findet in den letzten sieben Teilungen (17 – 23) statt. (Abbildung 1) (22).

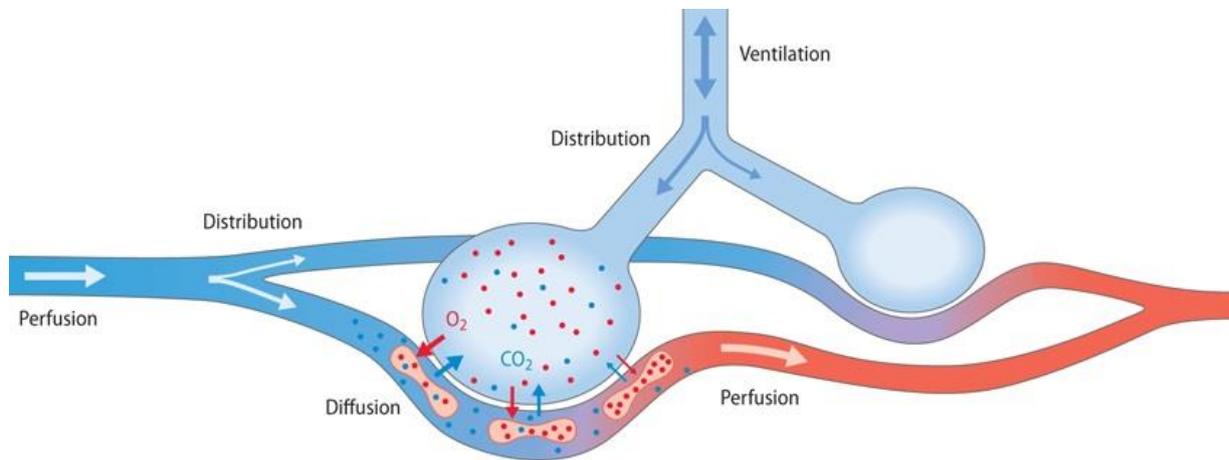


**Abbildung 1:** Das Bronchialsystem als symmetrischer Baum nach Weibel und Gomez (21) adaptiert von (23) – Luftleitungszone: Generationen 0 – 16 (Trachea, Bronchien, Bronchiolen), Respiratorische Zone: Generationen 17 – 23 (respiratorische Bronchiolen, Alveolargänge, Alveolensäcke)

### 2.1.1.2 Gasaustausch in den Alveolen

Das Bronchialsystem dient zum pulmonalen Gasaustausch zwischen Organismus und Umwelt. Dieser wird in drei Teilprozesse gegliedert. Der Austausch der exhalieren kohlendioxidreichen (CO<sub>2</sub>) gegen inhalede sauerstoffreiche (O<sub>2</sub>) Luft zwischen etwa 300 Millionen Alveolen und der Atmosphäre wird als Ventilation bezeichnet. Hierfür dient der konduktive Abschnitt der Atemwege, der die Luft gleichmäßig auf folgende Einheiten verteilt und somit eine Oberflächenvergrößerung schafft. Der effektive Gasaustausch durch die alveolo-kapilläre Membran ist die Diffusion, die im respiratorischen Abschnitt stattfindet. Diese funktionelle Oberfläche der Lunge macht etwa 140 m<sup>2</sup> aus (20). Die Geschwindigkeit der Atemluft wird in den Alveolen auf wenige Millimeter pro Sekunde verringert und

der Konzentrationsunterschied zwischen Alveolargas und venösem Blut kann effektiv ausgeglichen werden. Anschließend versorgt das sauerstoffreiche Blut durch Perfusion die jeweiligen Organe (24). Die folgende Abbildung 2 stellt den pulmonalen Gasaustausch dar.



**Abbildung 2: Pulmonaler Gasaustausch und Arterialisierung adaptiert von (25)** – dargestellt ist die Ventilation der exhalieren kohlendioxidreichen ( $CO_2$ ) gegen inhalierte sauerstoffreiche ( $O_2$ ) Luft zwischen den Alveolen und dem Blutkreislauf

### 2.1.1.3 Inhalative Aufnahme und Deposition von Partikeln

Die Aufnahme und Verteilung von Partikeln im Atemwegstrakt erfolgt in Abhängigkeit verschiedener Parameter wie der Partikelgröße und wird durch die drei Mechanismen Impaktion, Sedimentation und Diffusion beschrieben. Die Impaktion beruht dabei auf wirkenden Trägheitskräften. Die inhalierten Partikel können der Strömung der Atemluft nicht mehr in tiefere Abschnitte folgen und impaktieren an Verzweigungen. Dieser Abscheidemechanismus ist umso wahrscheinlicher, je größer die Geschwindigkeit der Atemluft, die Atemfrequenz, die Partikeldurchmesser und –dichten sind. Einen therapeutischen Nutzen hat dieser Trägheitsaufprall nur, wenn der Wirkort der inhalativen Therapie der obere Respirationstrakt ist. Dieses ist beispielsweise bei respiratorischen Infekten wie Entzündungen der Nase (Rhinitis), des Rachens (Pharyngitis) und des Kehlkopfes (Laryngitis) gegeben (26). Die Deposition aufgrund von Gravitationskräften wird als Sedimentation bezeichnet. Sie tritt in tieferen Abschnitten des Atemtraktes und bei Partikelgrößen zwischen 1 und 10  $\mu m$  auf. Je niedriger die Atmungsstärke und länger die Verweildauer, desto wahrscheinlicher ist die Sedimentation der Partikel. Die Diffusion beruht auf einer thermischen Bewegung der umgebenden Gasmoleküle, die als Brown'sche Molekularbewegung bezeichnet wird. Die Diffusionsgeschwindigkeit steigt mit sinkendem Partikeldurchmesser für Partikel kleiner als 1  $\mu m$ . Da durch Diffusion nur ein massenmäßig kleiner Teil des Wirkstoffs deponiert wird, ist die Sedimentation der bedeutendste

Abscheidemechanismus der unteren Atemwege (26). Die Herleitung des Depositionsweges eines inhalierten Partikels im Atemwegstrakt ist über dessen medianen massenbezogenen aerodynamischen Durchmesser (*mass median aerodynamic diameter*, MMAD) im Zusammenhang der jeweiligen Strömungsgeschwindigkeit möglich. Der MMAD wird dabei über den geometrischen Durchmesser, die Partikeldichte und –form definiert. Demnach impaktieren Partikel mit einem MMAD von  $\geq 10 \mu\text{m}$  aufgrund ihrer Trägheit schon am Rachen, Partikel zwischen  $0,1$  und  $1,0 \mu\text{m}$  hingegen diffundieren direkt oder werden wieder ausgeatmet. Die Partikelgrößen mit einem MMAD zwischen  $1$  und  $5 \mu\text{m}$  sedimentieren und lagern sich im respiratorischen System ab (27). Die Größenbereiche gängiger Partikel sind in folgender Abbildung 3 dargestellt.

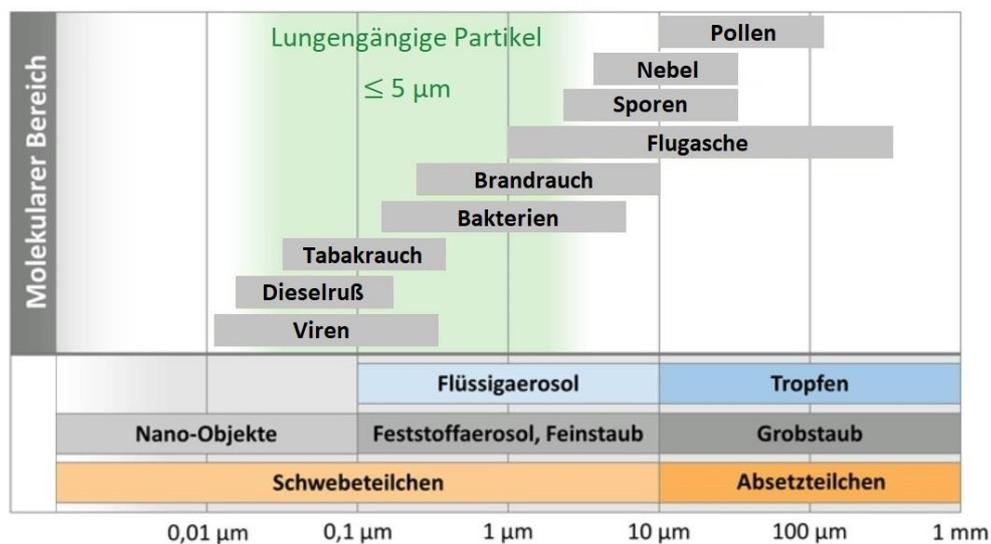
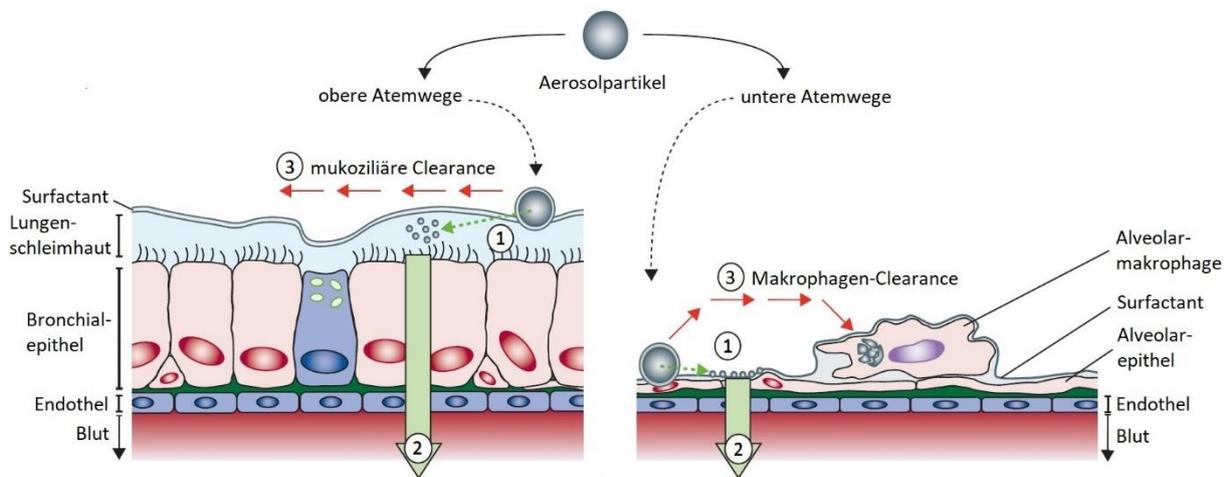


Abbildung 3: Arten und Größenbereiche von Beispiel-Partikeln modifiziert nach (28) – dargestellt ist der aerodynamische Durchmesser im Bereich von  $0,01 \mu\text{m}$  bis  $1 \text{mm}$  und die Klassifizierungen der Partikelarten

Bei der Betrachtung möglicher Wirkstoffe sind die Formulierung und ihre Wechselwirkung mit der Lungenschleimhaut und ihren Bestandteilen entscheidend. Dieser Schleim ist eine Hydrogelschicht, die hauptsächlich aus Wasser und Mucinen (Glycoproteine) besteht und einen aufsteigenden Abtransport, die mukoziliäre Clearance von Fremdkörpern bewirkt. Diese werden anschließend abgehustet oder geschluckt. In den unteren Atemwegen dominiert hingegen die Clearance durch alveolare Makrophagen, die nach der Phagozytose eines Partikels mukoziliär abtransportiert werden und Entzündungs- und Immunreaktionen auslösen können. Die gesamte Oberfläche der Atemwege ist außerdem mit einer dünnen Surfactant-Schicht überzogen, die aufgrund der Herabsetzung der Oberflächenspannung den Eintritt der inhalierten Substanzen ermöglicht.

Die Abbildung 4 verdeutlicht graphisch den Mechanismus der Deposition eines Partikels in der Lunge.



**Abbildung 4: Deposition eines Aerosolpartikels in der Lunge modifiziert nach (29) – ① Freisetzung des pharmazeutischen Wirkstoffes aus dem Aerosolpartikel in die Lungenschleimhaut, ② Absorption des Wirkstoffes durch das Lungenepithel, ③ Abtransport und Ausscheidung des ungelösten Partikels**

Das Ziel einer pulmonalen Applikation ist demnach stets eine schnelle Absorption mithilfe der Formulierung des Trägers, um den Clearance-Mechanismen, den Selbstreinigungsmechanismen der Bronchien, und somit einer vorzeitigen Eliminierung des Wirkstoffs entgegenzuwirken (29).

#### 2.1.1.4 Wirkung von deponierten Partikeln im humanen Organismus

Da die Zahl der zugelassenen Hilfsstoffe für die pulmonale Wirkstoffabgabe zur Verbesserung des Aerosolverhaltens von Formulierungen sehr begrenzt ist, kann eine bessere Verabreichungseffizienz durch die Entwicklung optimierter Partikelformulierungen erreicht werden. Der Wirkmechanismus nach der Partikeldeposition ist bei gut löslichen und permeablen pharmazeutischen Wirkstoffen die schnelle Aufnahme in den Blutkreislauf. Dieses trifft u.a. bei kleinen lipophilen Molekülen wie Nicotin zu. Diese schnelle Absorption der Aerosole ist wünschenswert und überwiegend bei den kommerziellen Produkten gegeben. Da das verfügbare Flüssigkeitsvolumen in der Lunge für die Auflösung begrenzt ist (10 – 30 mL), sind bereits gelöste Substanzen von Vorteil (30). Andere Mechanismen, die die Wirkstofffreisetzung verlängern oder verzögern sind moderne Applikationsmethoden, die bereits zugelassenen Produkten zuzuordnen sind. Ein Beispiel sind inaktive Vorstufen von Substanzen sogenannte Prodrugs, die erst nach Inhalation durch bronchiale Enzyme zu aktiven pharmazeutischen Wirkstoffen umgewandelt werden (29). Der Einsatz von Trägersystemen zur

Verkapselung des Wirkstoffes und Verlangsamung des Auflösungsprozesses beispielsweise in Form von Liposomen ist ebenfalls möglich. Die Vorteile einer Behandlung von Lungeninfektionen verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) mit liposomalem Tobramycin gegenüber der freien Form des Wirkstoffes konnten im Mausmodell bereits gezeigt werden. Liposomales Tobramycin induzierte sowohl eine schnellere Reduktion der koloniebildenden Einheiten des Bakteriums als auch eine länger anhaltende Wirkung. Aufgrund der hydrophoben Umhüllung des hygroskopischen Wirkstoffes bieten Liposomen ebenfalls eine Schutzfunktion vor Feuchtigkeit (31). Eine lange pulmonale Verweildauer spezifischer Wirkstoffe und somit eine längere Dauer der lokalen Wirkung trotz Verringerung der Dosierungshäufigkeit ist erstrebenswert. Eine retardierende Wirkung kann durch biologisch abbaubare Trägerstoffe oder Mikrosphärulen durch gleichmäßig verteilte Wirkstoffe in einer Polymermatrix erzielt werden. Darüber hinaus werden Möglichkeiten untersucht, wie Wirkstoffe, die über den *First-Pass*-Effekt metabolisiert werden, inhalativ appliziert werden können. Dadurch kann eine höhere Bioverfügbarkeit bei geringerer Dosierung erreicht werden. Ein weiterer Ansatz ist die Inhalation von systemisch wirkenden Peptiden oder Proteinen, wie Insulin und Heparin (29).

Im Allgemeinen werden Hilfsstoffe angewandt, um die physikalische und chemische Stabilität des Wirkstoffes oder seine pharmazeutischen Eigenschaften zu verändern, dabei jedoch inaktiv für die therapeutische Wirkung zu bleiben. Mögliche Substanzen für Trägersysteme müssen nicht nur ihre jeweilige Funktion erfüllen. Die Einstufung als unbedenkliche Substanz in inhalativer Form muss grundlegend zutreffen (32). Obwohl in der Literatur eine Vielzahl von Hilfsstoffen untersucht wird, ist nur eine begrenzte Anzahl für die pulmonale Verwendung zugelassen, da die zuständigen Behörden die Verwendung von etablierten Hilfsstoffen sowie allgemein als sicher anerkannten (*generally recognized as safe*, GRAS) Substanzen bevorzugen. In dieser Hinsicht sind im Vergleich zu oral applizierten Hilfsstoffen, die für die Inhalation zugelassenen relativ überschaubar aufgrund des Mangels an Sicherheitsdaten und Abbaumechanismen bzw. Stoffwechselrouten. Flüssige Formulierungen sollten auf den physiologischen pH-Wert und Osmolarität eingestellt werden, da im Gegensatz zum Magen-Darm-Trakt die Pufferkapazität der Lunge begrenzt ist. Zur Einstellung werden Substanzen wie Salzsäure, Natriumhydroxid, Zitronensäure, Natriumchlorid und Phosphate verwendet. Die Löslichkeit von Wirkstoffen und Überwindung der Grenzflächenspannung wird anhand geringer Mengen an Ethanol oder Tensiden wie Polysorbate oder Sojalecithin reguliert. Zur Stabilisierung können Aminosäuren (z.B. Leucin, Glycin und Alanin), kleine Kohlenhydrate (z.B. Lactose, Glucose und Mannitol) oder Polymere (z.B. Polyethylenglycol, Polyvinylpyrrolidon) verwendet werden. Ein verzögertes Freisetzungsverhalten kann beispielsweise durch Zubereitungen mit Chitosan oder Glycerin begünstigt werden (33). Ähnlich wie die Eigenschaften der bereits beschriebenen Liposomen bieten Cyclodextrine apolare Hohlräume, die hydrophobe Wirkstoffe einschließen und verzögert

freisetzen können. Einige Formulierungen enthalten Konservierungsmittel wie Methylparaben und Propylparaben oder Antioxidantien wie Ascorbinsäure, um eine langfristige Konservierung zu gewährleisten. Es werden sogar Geschmacksregulatoren (Aromen, Süßstoffe) zur Verbesserung der gustatorischen Wahrnehmung aber auch als Indikator einer erfolgreichen Einnahme verwendet (34).

Die meisten inhalativen Anwendungen sind verbunden mit einer Hypersekretion, mit Entzündungen und Ödemen und mit Spasmen der Bronchialmuskulatur. Die häufigsten Wirkstoffe sind Glucocorticoide,  $\beta_2$ -Sympathomimetika und Antibiotika. Die klassischen Applikationen zur lokalen Therapie beruhen grundsätzlich auf der Behandlung von Asthma bronchiale und der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Die Erkrankung Asthma beruht auf einer chronischen Entzündung der Atemwege, die mit anfallsweiser Atemnot infolge einer Bronchialobstruktion einhergeht. Die bronchiale Hyperaktivität reagiert darauf mit vermehrter Schleimsekretion, Verkrampfung der Bronchialmuskulatur und Bildung von Ödemen. Ähnliche Symptome werden auch bei an COPD erkrankten Patienten beobachtet. Allerdings ist die Obstruktion hier dauerhaft und eine Überempfindlichkeit der Atemwege wird eher selten beobachtet. Die Bronchodilatoren bewirken die Weiterung von verengten Bronchien. Die Wirkstoffgruppe der  $\beta_2$ -Sympathomimetika stimuliert die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren, welche eine Entspannung der Bronchialmuskulatur bewirken (35). Die Anticholinergika hingegen hemmen den muskarinischen Acetylcholinrezeptor kompetitiv und unterdrücken somit Nervenreize, die Kontraktionen hervorrufen (36). Die inhalative Anwendung muss die glatte Atemwegsmuskulatur der Bronchien und Bronchiolen erreichen somit die Regionen des Atemtrakts, die von Obstruktion betroffen sind. Die Glucocorticoide werden allein oder in Kombination mit einem Bronchodilatator eingesetzt. Sie werden inhalativ ausschließlich angewendet, um entzündungshemmend Symptome von Asthma und COPD zu lindern und somit den Einsatz der Bronchodilatoren zu senken (37). Die Inhalationstherapie ist ebenfalls von Bedeutung bei der Behandlung von Mucoviszidose (*cystic fibrosis*, CF). Der überwiegende Anteil der Patienten stirbt an Lungenzerstörung in Verbindung mit chronischen *P. aeruginosa*-Lungeninfektionen. Diese Infektionen können nur mithilfe von hohen topischen Konzentrationen von Antibiotika (z.B. Tobramycin, Aztreonam und Levofloxacin) verabreicht über Vernebler unter Kontrolle gehalten werden. Die Substanzen verfügen dabei über eine sehr geringe orale Bioverfügbarkeit, die über die pulmonale Applikation gesteigert werden kann (38). Neben der Behandlung von Infektionen wird die inhalative Therapie eingesetzt, um die zähflüssige Schleimschicht abzubauen und die mukoziliäre Clearance und die Hydratation der Atemwege zu verbessern (15). Aerosolierte Impfstoffe gehören zu den nicht-konventionellen Anwendungen. Der Einsatz zur Grippeprävention wurde als Nasenspray – aber auch als sprühgetrocknete Formulierung – bereits angewandt. In den 1990er Jahren wurden Kinder inhalativ gegen Masern geimpft, dabei zeigte sich eine potentiell verbesserte Immunreaktion im Vergleich zur Injektion. Ein dreifacher Impfstoff gegen Masern, Mumps und Röteln als Trocken-

Pulverformulierung befindet sich momentan in der Entwicklung (39). Aber auch die systemische Applikation von aerosolisierten Wirkstoffen spielt zunehmend eine Rolle in der Inhalationstherapie. Die Physiologie und die hohe Absorptionskapazität der Lunge bieten aufgrund der großen Oberfläche und der dünnen Epithelschicht eine potentielle Applikationsmöglichkeit von peroral nicht bioverfügbaren kleinen aber auch größeren Molekülen (z.B. Peptide, Proteine). Die Größe und Polarität begrenzt die Permeation durch das Darmepithel und enzymatischer Abbau durch Peptidasen und Proteinasen führt zur Inaktivierung. Die konventionelle Injektion beeinträchtigt gerade bei chronischen Erkrankungen die Compliance. Das Potenzial als pulmonale nicht-invasive Option für die systemische Verabreichung haben Wirkstoffe wie Insulin und Fentanyl bereits bewiesen und werden klinisch untersucht. Auch hier ist die Formulierung und die Technik entscheidend, da die Denaturierung und Inaktivierung aufgrund von Wechselwirkungen mit anderen Inhaltstoffen, thermischer Belastung oder enzymatischem Abbau ein Stabilitätsproblem darstellen könnte (33). Außerdem werden inhalative Nicotinersatzprodukte zur Reduzierung des Tabakkonsums angewandt. Angesichts der Bedeutung der Aerosoltherapie stehen einige stationäre und portabelmobile Geräte zur inhalativen Applikation von pharmazeutischen Wirkstoffen über die Fest- oder Flüssigphase zur Verfügung.

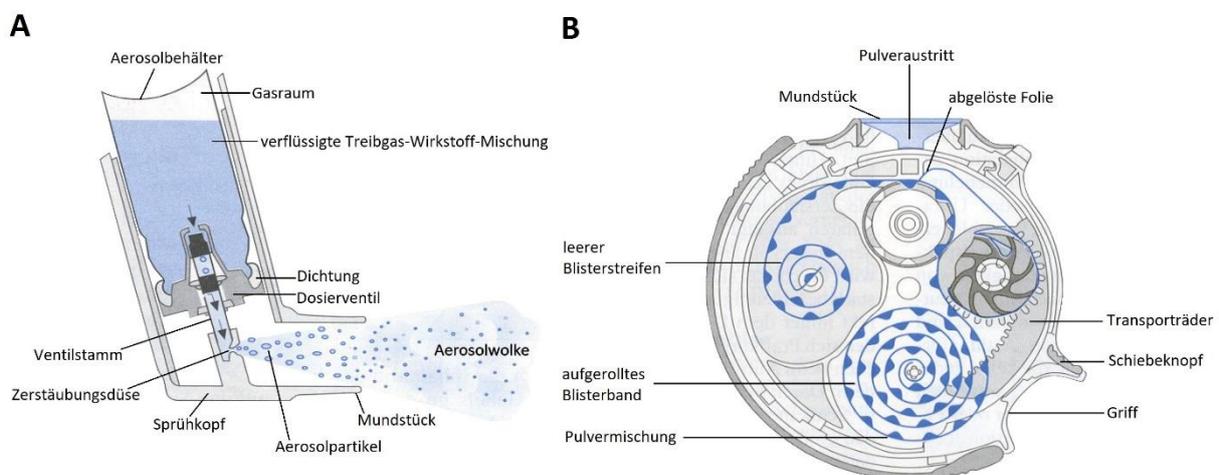
### 2.1.2 Technologien zur Inhalation von Substanzen

Die Inhalation ist keineswegs eine moderne Applikationsroute von Wirkstoffen zu therapeutischen Zwecken. Sie reicht Jahrtausende zurück und ihre Entwicklung konnte sinnvoll rekonstruiert werden. Die erste therapeutische Aerosolverabreichung wird auf einer altägyptischen Papyrusrolle aus dem Jahr 1554 v. Chr. beschrieben (15). Zur Anwendung von Atemnot wurde ein Gefäß mit Schilfrohr im Deckel empfohlen, welches die alkaloidhaltigen Dämpfe von erhitztem Bilsenkraut in die Atemwege leitet. Neben der hier beschriebenen Wirkung von inhalativ verabreichten Alkaloiden ist die wohl bekannteste antike inhalative Applikation zu therapeutischen aber auch zu Genusszwecken, die des Opiums unter Verwendung von Pfeifen. Die Inhalation von Wasserdampf mit möglichen Supplementen zur Befeuchtung der Atemwege wurde in der Antike in öffentlichen Bädern praktiziert. In Indien wurde 600 v. Chr. die erste therapeutische Maßnahme zur Linderung von Asthma formuliert. Das Verbrennen von Kräutermischungen durch Pfeifen und Zigaretten führte zu einer Abschwächung von Asthmasymptomen, wurde allerdings auch zur Sedierung und Narkose in Form von Cannabisrauch verwendet (15). Auch Hippokrates (460 – 377 v. Chr.) beschrieb ähnliche Inhalationsweisen zur Behandlung von Krankheiten. Der griechische Arzt Galen formulierte wohl die ersten Pulverinhalationen um 150 v. Chr. zur Behandlung von Angina. Inhalationsgeräte oder Inhalationshilfen zur Applikation von Rauch verbrannter Pflanzen finden sich in allen Kulturen in

diversen Variationen wieder, aber erst mit dem Beginn der industriellen Revolution 1760 ermöglichten neue Herstellungsmöglichkeiten und technische Entdeckungen eine Massenproduktion von Inhalationsgeräten. Den Begriff „Inhalator“ prägte im Jahr 1778 der englische Arzt John Mudge durch seine Erfindung der Inhalation von Opiumdampf zur Behandlung von Husten. Dieser Inhalator in Form eines Zinnkruges diente der Erzeugung und Abgabe von Aerosolen auf Dampfbasis (40). In der Mitte des 19. Jahrhunderts wurde die Technologie des Zerstäubens in Frankreich weiterentwickelt. Als Reaktion auf die Nutzung von Thermalbädern zu therapeutischen Zwecken wurde ein Zerstäuber von Dr. Sales-Girons erfunden, der Flüssigkeit mit Hilfe eines Pumpengriffs aus dem Reservoir ansaugte, durch eine Düse gegen eine Platte drückte und somit einen feinen Sprühnebel erzeugte. Zeitgleich wurden in England verschiedene Keramik-Inhalatoren mit ähnlicher Funktionsweise wie der Mudge-Inhalator zur Erzeugung medizinischer Dämpfe kommerzialisiert (15). Ein bedeutender Fortschritt der therapeutischen inhalativen Applikation war die Erfindung von Geräten, die eine feine Verteilung von Tröpfchen ermöglichen. Diese können in Zerstäuber (*Atomizer*) und Vernebler (*Nebulizer*) eingeteilt werden. Die *Atomizer* erzeugen eher grobe Aerosolsprays, von denen nur ein kleiner Teil die unteren Atemwege erreicht. Die *Nebulizer* hingegen verfügen über eine Technologie, die große Tröpfchen aus dem Luftstrom entfernt und somit die erzeugten feinen Aerosole tief in die Lunge eindringen und wirken können. Der Beginn der Vernebler-Therapie im Jahr 1862 wurde vom deutschen Arzt Bergson durch die apparative Grundlage für den heutigen Düsenvernebler geschaffen (Venturi-Düsen-System), einer Zerstäubung aufgrund von der Druckdifferenz in zwei Glasrohren. Der möglicherweise erste Pulverinhalator (DPI) wurde 1889 von Frederick Roe in Form eines Karbol-Rauchball patentiert. Dieser hohle Gummiball erzeugte durch das Zusammenrücken ein Pulveraerosol. Im 20. Jahrhundert wurden vermehrt brennbare Pulver und Zigaretten zur Behandlung von Asthma und anderen Lungenbeschwerden verwendet (41). Die Unterzeichnung des *Food and Drug Act* von 1906 veränderte die Entwicklung und Erprobung von aerosolisierten Therapeutika. Infolgedessen wurden die Durchführung und Veröffentlichung kontrollierter klinischer Studien zur Bewertung der Wirksamkeit verschiedener therapeutischer Aerosole essentiell. Im Jahr 1927 wurde das erste Patent in den Vereinigten Staaten für eine elektronische Applikation zur medizinischen Anwendung von Joseph Robinson angemeldet (42). Obwohl dieser Applikator nie vermarktet wurde, etablierte sich die Grundidee in den folgenden Jahrzehnten. Die arzneimittelrechtliche Zulassung des ersten Druck-Dosierinhalators (*pressurized metered dose inhaler*, pMDI) mit Epinephrin und Isoproterenol zur Behandlung von Asthma durch die Riker Laboratories im Jahr 1956 war ein Meilenstein in der Entwicklung der inhalativen Arzneimittel (41). In einigen Fällen setzten sich die neuartigen inhalativen Applikationen jedoch gegenüber den konventionellen Anwendungen nicht durch, da Schwierigkeiten in der Synchronisierung der Einatmung mit der Verabreichung der Dosis auftraten, was zu einer geringeren Wirkung und Akzeptanz bei den Patienten führte. Daraufhin wurden atemzugaktivierende

Dosierinhalatoren konstruiert. Die parallele Entwicklung der Ultraschallvernebler führte zu verschiedenen Variationen an Geräten, die atemunterstützt, atemaktiviert und vordosiert arbeiten. Eine wichtige Innovation in dieser Zeit war die Einführung eines Verneblers durch Robert Lang im Jahr 1962, der einen piezoelektrischen Kristall zur Zerstäubung der Lösung durch Erzeugung von Hochfrequenz-Ultraschallschwingungen nutzte und damit feinere Aerosole ermöglichte (15). Die bis dahin an Popularität zunehmende Anwendung an Inhalationsaerosolen konnte kaum wissenschaftliche und klinische Belege aufweisen. Im Jahr 1974 wurde auf der zukunftsweisenden Konferenz über die wissenschaftlichen Grundlagen der Atmungstherapie (*Conference on the Scientific Basis of Respiratory Therapy*) in Philadelphia beschlossen und in der Beilage der „*American Review of Respiratory Disease*“ veröffentlicht, dass es an fundamentalen Doppelblindstudien bedarf. Es sollte an mathematischen Modellen zur Lungendeposition und an der Leistung der Inhalatoren geforscht werden (17). Im Jahr 1987 führte die Unterzeichnung des Montrealer Protokolls, welcher die Abschaffung der Treibmittel auf Basis von Fluorchlorkohlenwasserstoffen (FCKW) vereinbarte, zu einem Innovationsschub der Entwicklung alternativer FCKW-freier Inhalationstechnologien. Aber auch die Entwicklung der DPIs wurde vorangetrieben und es erschienen Multidosis-Pulverinhalatoren mit Blisterstreifen-Mechanismus als geschlossenes System zur Applikation. Auch die DPI-Technologie musste in ihren Abgabeformulierungen in Bezug auf Fließeigenschaften, Partikelgröße und Deagglomeration optimiert werden, um lungengängige Aerosole freizusetzen. Im Jahr 2004 wurde das erste kommerzielle wässrige Inhalationsspray-System von der Firma Boehringer Ingelheim entwickelt und zugelassen. Diese Technologien wurden maßgeblich durch wissenschaftliche Entwicklungen in verschiedenen Bereichen beeinflusst: theoretische Modellierung und indirekte Messungen der Lungenablagerung, Partikelgrößenverfahren und Depositionsstudien *in vitro*, Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. Die Partikelgröße spielt dabei die entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Technologien für pulmonale Applikationen. Die optimale Partikelgröße MMAD liegt bei 1 – 5 µm. Um diese zu erreichen, bedarf es nicht nur einer geeigneten Technologie, aber auch der entsprechenden Formulierung. Die gängigsten Verfahren sind Mikronisierung, Sprüh-(gefrier-)trocknung, überkritische Fluidkristallisation und Herstellung von Doppelemulsionen. Aber auch die Trägersysteme, die den unveränderten Wirkstoff zum Wirkort bringen sollen, sind entscheidend. Die Wirkstoffe können beispielsweise in Mikro- oder Nanopartikeln eingekapselt oder eingeschlossen in Liposomen gezielter freigesetzt werden (43). Die heutigen kommerziellen inhalativen Technologien können im Wesentlichen in drei Kategorien eingeteilt werden. Die Anwendung der ersten Gruppe der Dosierinhalatoren (MDI) erfordert für ein gutes therapeutisches Ergebnis die Schulung der Patienten, da die Koordination von Einatmung und Betätigung des Inhalators notwendig ist, um die gewünschte Partikelgröße MMAD von weniger als 5 µm zu erreichen und das Aufprallen gegen den Oropharynx zu verhindern. Die Inhalation sollte langsam, tief und geräuschlos erfolgen, gefolgt vom Anhalten des

Atems (44). Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass viele Patienten nicht in der Lage sind diese Atemtechnik zu reproduzieren (45–48). Dosierinhalatoren gehören zu den aktiven Inhalatoren, da ein Applikator die Zerstäubung aktiviert. Die tragbare Bauweise ist kompakt, kostengünstig und ermöglicht eine Multidosis-Freisetzung (49). Diese Inhalatoren können nochmals unterteilt werden in unter Druck (pMDI) und nicht unter Druck betriebene Geräte. Die pMDIs gehören zu den häufigsten Technologien. Das Treibmittel ist ein komprimiertes, verflüssigtes Gas, welches zur Gleichförmigkeit der Abgabe den Dampfdruck konstant aufrechterhalten muss und heutzutage aus FCKW-freien Hydrofluoralkanen (HFA) besteht. Die neuste Generation dieser Geräte ist atmungsgesteuert. Hierbei ist keine Koordination zwischen dem Auslösen des Aerosols und der Einatmung notwendig. Der Anwender steuert, wie bei der elektronischen Zigarette die Applikation selbst und aktiviert durch einen Zug den Mechanismus. Die drucklosen Dosierinhalatoren (MDI) geben einen feinen Wirkstoffnebel ab, der tief in die Atemwege eindringen kann und somit im Gegensatz zu den pMDIs eine geringere Dosis für die gleiche therapeutische Wirkung benötigt (43). Die zweite Gruppe der Inhalatoren, die Trocken-Pulverinhalatoren (DPI), besteht aus einer trockenen Pulversuspension, die bei der Inhalation flüssig wird. Die Wirkstoffe erfordern hier eine Mikronisierung und eine Kombination mit einem Trägerpartikel, um eine Deposition in den unteren Atemwegen zu ermöglichen. Sie werden passiv mit in den Atemstrom eingeführt und sollten rasch und gut hörbar angewandt werden. Die Einzel- oder Mehrdosensysteme geben die Dosen aus Kapseln, Blistern oder Reservoirs frei. Eine optimierte Deposition gelingt nur durch angehaltenen Atem über einige Sekunden und anschließendes langsames Ausatmen. In folgender Abbildung 5 wird der Unterschied zwischen dem Mechanismus der Dosierinhalatoren und der Pulverinhalatoren am Beispiel eines pMDI (A) und eines Diskus-DPI mit Blisterstreifen (B) deutlich.



**Abbildung 5: Medizinische Inhalatoren zur Applikation von Arzneimitteln adaptiert von (50)** – dargestellt ist der schematische Aufbau der medizinischen Inhalatoren, A = Dosierinhalator, B = Pulverinhalator

Die Anwendung der dritten Gruppe der Inhalatoren, der Vernebler (Nebulizer) ist im Gegensatz zu anderen Inhalationen zeitaufwendiger, jedoch praktikabel einfach. Die Erzeugung von feinen Flüssigkeitstropfen erfolgt auf drei verschiedenen Funktionsweisen. Der bereits erwähnte Venturi-Effekt wird von den Düsenverneblern technologisch umgesetzt. Es wird mithilfe eines Luftstroms ein Unterdruck erzeugt, der die Lösung mitzieht und das Aerosol versprüht. Ein im Aerosolstrom platziertes Ablenkblech trägt dazu bei, die Bildung von lungengängigen Partikeln (MMAD = 1 – 10  $\mu\text{m}$ ) zu gewährleisten und gleichzeitig das Einatmen größerer Tröpfchen zu verhindern. Die Membranvernebler pressen die Lösung durch Mikrobohrungen, die in ihrer Größe angepasst sind an die lungengängigen MMAD des Aerosols ( $\varnothing = 3 \mu\text{m}$ ). Die dritte Untergruppe sind die Ultraschallvernebler. Sie wandeln elektrische Energie in hochfrequente Ultraschallwellen um. Diese wiederum erzeugen die mechanischen Vibrationen eines Piezokristalls, welcher die Hochfrequenzschwingungen (1 – 3 MHz) auf die Oberfläche des Flüssigkeitsbehälters überträgt und ein Aerosol erzeugt. Dabei gilt je höher die Frequenz, desto kleiner die erzeugten Partikel (51). Die Vernebler erzeugen hohe Dosen durch die kontinuierliche Betriebsart. Dadurch sind sie sehr ineffizient, schlecht reproduzierbar und zeitaufwendig, brauchen aber keine umfangreiche Schulung des Patienten. Aufgrund der schweren Kompressoren, der deutlichen Lautstärke und der benötigten Energiequelle eignen sie sich nicht zum täglichen Transport. Zusätzlich besteht ständiger Reinigungsbedarf aufgrund des hohen Risikos einer bakteriellen Kontamination. Wie bei allen anderen vorgestellten Inhalatoren muss die Formulierung auf die Technologie abgestimmt sein (49). Zu den Inhalationstechnologien gehören ebenfalls die Nasensprays. Sie erzeugen grobe Aerosole (MMAD =  $>40 \mu\text{m}$ ), die durch Impaktion im Nasen-Rachenraum eingesetzt werden. Das Ziel dieser therapeutischen Maßnahme ist die lokale Abschwellung oder die Linderung von allergischen Zuständen. Diese Anwendung ist sehr bedeutend, da die Ruheatmung der meisten Menschen durch die Nase geschieht. Bei leichter körperlicher Anstrengung kommt die Mundatmung im Wechsel hinzu und erst bei mittlerer körperlicher Belastung wird nur durch den Mund geatmet, da der Widerstand durch die oralen Atemwege viel geringer ist als in den nasalen Atemwegen (52).

Für eine erfolgreiche therapeutische Inhalation ist jedoch auch das Erzeugen einer hohen Lungendeposition entscheidend. Eine Review-Publikation von Joseph L. Rau aus dem Jahr 2005 fasste die Untersuchungen der Lungendeposition von gängigen Inhalatoren aus den 1980er Jahren in folgender Abbildung zusammen:

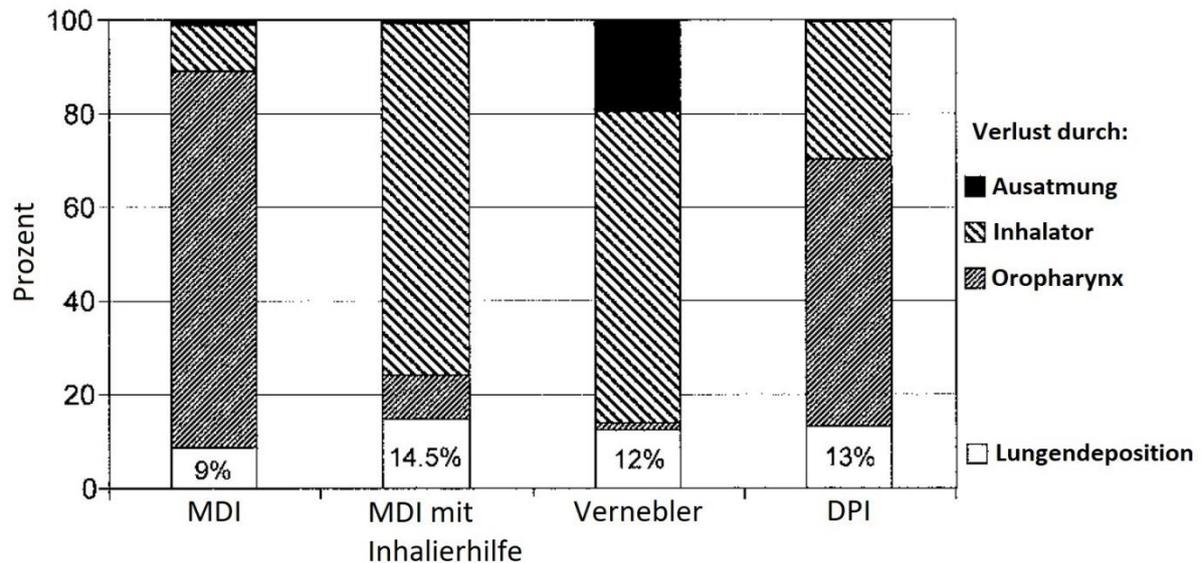


Abbildung 6: Prozentuelle Verteilung der Wirkstoffdeposition aus Inhalatoren der 1980er Jahre modifiziert nach (17) – dargestellt ist der prozentuelle Verlust der Wirkstoffe aufgrund von Ausatmung, der Bauweise des Inhalators oder der Impaktion im Rachen im Vergleich zur gewünschten Lungendeposition. MDI = metered-dose inhaler, Dosierinhalator; DPI = dry powder inhaler, Pulverinhalator

Die Daten über die Effizienz der Medikamentenabgabe durch die dargestellten Aerosolgeräte zeigten eine Lungendeposition von 9 – 14,5% der gesamten Nenn-dosis. Die zwei größten Faktoren für den Wirkstoffverlust sind die Bauweisen der Inhalatoren und der oropharyngeale Verlust. Am Beispiel der MDIs ist deutlich zu erkennen, dass der Gebrauch einer Inhalierhilfe eine verminderte Impaktion im Rachen bewirkt, dagegen aber die Partikel am Gerät verbleiben. Da Vernebler besonders kleine Partikel erzeugen, werden diese wieder ausgeatmet. Der Verlust durch das Gerät liegt hier an der kontinuierlichen Erzeugung des Aerosols (17). In aktuellen Studien konnte gezeigt werden, dass es wichtig ist ein ganzheitliches Studiendesign zu verfolgen und mehrere Faktoren zu beachten. Die Lungendeposition hängt abgesehen von der Inhalationstechnik stark von Merkmalen des Patienten (z.B. Atemwegsgeometrie, Inspirationskapazität, Inhalationstechnik, Atemanhaltezeit) und der Formulierung des Arzneimittels ab. So zeigte eine Review-Publikation von Baloira *et al.* aus dem Jahr 2021, dass die Effizienz der Lungendeposition bei COPD-Patienten untereinander viel stärker variiert. Bei Druck-Dosieraerosolen erreichen 8 – 53% (MMAD = 1,22 – 8 µm) und bei Pulveraerosolen 7 – 69% (MMAD = 1,8 – 4,8 µm) die unteren Atemwege. Die Vernebler hingegen

erzeugen ein Aerosol, welches zu 39 – 67% (MMAD =  $<5 \mu\text{m}$ ) in der Lunge deponiert werden kann (53). Vergleichsstudien zur Beurteilung der relativen Bioverfügbarkeit von Tobramycin konnten eine bis zu neunfache Steigerung von Formulierungen zur Applikation mithilfe von Pulverinhalatoren gegenüber Verneblern feststellen (54, 55). Viele weitere Studien zeigen ähnlich starke Schwankungen, die aufgrund der bereits erwähnten Variablen erklärt werden können (56–59).

Die Definition eines idealen Inhalators nach Wolff und Niven aus dem Jahr 1994 zeichnet sich aus in der Zuverlässigkeit, Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der Freisetzung. Er sollte einfach in der Anwendung, transportabel und kosteneffizient sein, um die Compliance zu stärken. Die Größe der aerosolisierten Partikel muss außerdem klein genug sein, damit sich das Aerosol mit hoher Effizienz in der Lunge absetzen kann (MMAD =  $1 - 5 \mu\text{m}$ ). Weitere anwenderfreundliche Merkmale sind die Fähigkeit zur Mehrfachdosierung, Haltbarkeit und Widerstandsfähigkeit gegen Kontaminationen (60). Diese Vielfalt an Anwendungstechnologien ermöglicht eine jeweils maßgefertigte Applikation von unterschiedlichen pulmonalen Wirkstoffen. Bei einer pharmazeutischen Zulassung eines Arzneimittels bedarf es klinischer Studien, um die spezifische, partikelgrößenabhängige Aufnahme und Wirkung sowie den Wirkort einer bestimmten Substanz im Zusammenspiel mit dem Trägersystem der Formulierung und angewandter Technologie zu charakterisieren. Die eingesetzten Wirkstoffe müssen während der Anwendung aber auch bei Lagerung chemisch und physikalisch stabil sein.

### 2.1.3 Technologie der e-Zigarette

#### 2.1.3.1 Entwicklung der Technologie und gesetzliche Regulierung

Die Technologie der elektronischen Zigarette wurde bereits im Jahr 1963 von dem Amerikaner Herbert A. Gilbert als Patent angemeldet (61). Die Grundprinzipien dieser verbrennungs- und tabakfreien Alternative stimmen mit den heutigen kommerziellen Varianten mit Liquidtank und Batterie überein. Dieses Patent wurde jedoch nie kommerzialisiert, da elektrische Geräte dieser Art massenhaft nicht finanzierbar und die Leistungen der Batterien nicht effizient genug waren. Hinzu kam der kulturelle Aspekt, dass das Rauchen einer Tabakzigarette in den 1960er Jahren gesellschaftlich akzeptiert war, da medizinische Langzeitstudien zu den Spätfolgen fehlten (62). Bis zum 21. Jahrhundert gab es keine ernstzunehmenden Weiterentwicklungen bis im Jahr 2003 das Patent von Gilbert von dem chinesischen Pharmakologen Hon Lik technisch überarbeitet und modern interpretiert wurde. Das resultierende Gerät führte schließlich im Jahr 2007 zu einem internationalen Patent und Erfolg. Bereits damals wurde das Nicotin in dem noch heute konventionellen Propylenglycol gelöst und mithilfe einer Heizwendel in Kombination mit einem hochfrequenten, Ultraschall emittierendem Piezoelement zu

einem sichtbaren Dampf vaporisiert (63). Seit der Einführung der elektronischen Zigarette auf dem Weltmarkt stieg deren Anwendung, während das Image und der Konsum von Tabakprodukten stetigem Wandel unterlag und zurückging. Das Bewusstsein für gesundheitliche Risiken stieg aufgrund von fundierten wissenschaftlichen Studien und die Kosten stiegen kontinuierlich durch Steuerbelastungen. In Deutschland entstand im Jahr 2007 das Bundesgesetz zum Nichtraucherschutz, welches zu flächendeckenden Rauchverboten führte. Die e-Zigarette füllte dieses entstandene Vakuum, da die gesetzliche Situation weitestgehend ungeklärt war (62). Die Rechtslage sah die rauchfreie e-Zigarette nicht als Medizinprodukt im Sinn des Arzneimittelgesetzes (64). Dieses urteilte das Verwaltungsgericht München im Jahr 2013 und wurde bereits mit drei Revisionsverfahren rechtmäßig bestätigt (65–67). Es liegt demnach keine Apothekenpflicht vor. Elektronische Zigaretten konnten nach diesem Urteil frei verkäuflich ohne Altersbeschränkung erworben werden. Erst im Jahr 2016 wurde nach einer Novellierung des Jugendschutzgesetzes in §10 Absatz 1–3 die e-Zigarette ins Tabakerzeugnisgesetz aufgenommen und der Erwerb für Minderjährige offiziell verboten (68). Es gilt ein Kauf- und Nutzungsalter ab dem 18. Lebensjahr. Heutzutage sind Herstellung und Abgabe der nicotinhaltigen Liquids in Europa streng reguliert und die erlaubten Inhaltsstoffe müssen eine hohe Reinheit aufweisen. Eine Änderung des Tabakerzeugungsgesetzes führte ab dem 01.01.2021 zu einer Regulierung auch von nicotinfreien Produkten. Bestimmte Additive, die einen gesundheitlichen Nutzen suggerieren (z.B. Vitamine) oder stimulierende Stoffe (z.B. Coffein) sind grundsätzlich verboten. Aromen wie 2,3-Butandion, Polei-Minze und Stoffe, die das Aerosol färben, dürfen ebenfalls nicht als Inhaltsstoffe angewandt werden. Substanzen, die krebserregende, erbgutverändernde oder fortpflanzungsschädigende Eigenschaften (*carcinogenic, mutagenic and toxic to reproduction*, CMR-Eigenschaften) im unverdampften Zustand aufweisen, dürfen kein Bestandteil von Liquids sein (69).

Das erste Modell der elektronischen Zigarette bestand aus drei Teilen: einer Batterie, einer mit Liquid gefüllten Kapsel und einem Heizelement. Der Anwender aktiviert durch das Einsaugen einen elektronischen Sensor, der den Luftstrom erkennt und das Heizelement aktiviert. Das Liquid wird erhitzt und als Aerosol eingeatmet (70). Im Jahr 2007 wurde von den britischen Unternehmern Umer und Tarip Sheikh der Cartomizer entwickelt, der das Heizelement und den Liquidtank in einem Kartuschensystem integriert. Die steigende Nachfrage führte zu Modellen mit leistungsfähigeren Akkus und austauschbaren, wieder befüllbaren Tanks. Im Jahr 2009 wurde der Clearomizer erfunden, ein Bauteil bestehend aus einer austauschbaren Heizspule mit Baumwolldocht (*Atomizer*) und einem transparenten (*clear*) Liquidtank zur Überwachung des Füllstandes. Der Begriff e-Zigarette umfasst eine sehr vielfältige Produktpalette mit unterschiedlichen Design-, Funktions- und Leistungsmerkmalen. Eine mögliche Einteilung erfolgt nach technischen Entwicklungen in vier Typen: Die elektronischen Zigaretten der ersten Generation („*Cig-a-like*“) ähneln in Größe, Gewicht und

Aussehen kommerziellen Verbrennungszigaretten. Sie sind einfache zweiteilige Geräte, die aus einem geschlossenen Cartomizer und einer Batterie bestehen. Das Liquid ist gebunden an ein Absorptionsmittel, welches das Heizelement umgibt und den Transfer gewährleistet. Sowohl die Aerosolbildung als auch die Applikation des Nicotins gemessen am Plasmaspiegel von Probanden sind signifikant geringer verglichen mit den darauffolgenden Generationen an e-Zigaretten (71). Die mehrteiligen Geräte der zweiten Generation zeichnen sich vor allem durch wiederbefüllbare transparente Tanks und austauschbare Zerstäuber aus („Vape-pen“). Der Füllstand kann funktional ständig beobachtet werden. Die Leistung der Batterien, eGO genannt, ist im Vergleich zur ersten Generation höher und das Aussehen erinnert an einen großen Stift. Sie haben in der Regel eine zylindrische Form mit einem Tank aus klarem Kunststoff oder Glas. Der Docht ist entweder oben oder unten im Tank angebracht, wobei die erste Form längere Döchte erfordert und zu einer schlechteren Flüssigkeitsaufnahme führen kann (72). Bei diesen Geräten konnte sich bereits das 510-Gewinde, ein metrisches ISO-Feingewinde, zum inoffiziellen Standard zur Verbindung von Akku und Verdampfer etablieren. Die e-Zigaretten der dritten Generation werden auch „Mods“ (Modifikationen) genannt. Die Akkus mit sehr großer Kapazität können in ihrer Leistung (Watt) oder Spannung (Volt) variabel eingestellt werden, so dass sie in der Nicotin-Abgabe vergleichbar mit herkömmlichen Tabakzigaretten sind. Dabei kann ein Volumen von 5 bis 40 mL je nach Modell mit einer Akkuladung verdampft werden (73). Sie haben viele austauschbare Bauteile mit unterschiedlichen Eigenschaften wie beispielsweise Widerstände und Döchte. Sie können einfach individuell gestaltet und angepasst werden. Das Dochtmaterial kann aus unterschiedlichen Materialien hergestellt werden, wie z.B. Kieselerde, Polyester Füllwatte, Baumwolle oder anderen hitzebeständigen, absorbierenden Materialien. Da der Cartomizer mit der Flüssigkeit in Berührung kommen muss, befindet er sich normalerweise am Boden des Tanks. Aufgrund der Verwendung sehr kurzer Döchte und des direkten Kontakts mit der Flüssigkeit haben die Tanks eine gute Flüssigkeitsaufnahme und sind in vielen Leistungsbereichen erhältlich (74). In der dritten Generation sind auch selbst gewickelte Verdampfer möglich, die so genannten RBAs (*Rebuildable Atomizer*). Ein weiteres Merkmal ist die Temperaturregelung der Zerstäuberspule. Nicht temperaturgeregelter Geräte verwenden Kanthal®- oder Nickel-Chrom-Legierungen, da deren physikalische Eigenschaften bei wechselnden Temperaturen relativ konstant bleiben. Sie haben einen relativ hohen spezifischen elektrischen Widerstand und eine geringe Neigung zur Oxidation. Je höher der spezifische Widerstand, desto geringer die elektrische Leitfähigkeit. Dies vereinfacht die Steuerung und ermöglicht den Einsatz von Geräten mit direkter Batterie und variabler Spannung. Kanthal® ist die Bezeichnung einer Marke von Eisen-Chrom-Aluminium-Legierungen. Seit dem Jahr 2010 werden Geräte mit softwaregesteuerter Ausgangsleistung und direkter Steuerung der Wattzahl produziert. Die Geräte mit variabler Leistung können ein konstantes Aerosol bei Änderung des Widerstandes der Heizspirale produzieren. Die vierte

Generation zeichnet sich in der Weiterentwicklung und Optimierung der Bauteile aus. Bei temperaturgeregelten Geräten werden reine Materialien, wie Nickel, Titan und Edelstahl für die Heizdrähte verwendet, die bei Temperaturänderungen signifikante, reproduzierbare Änderungen des Widerstands erfahren. Der Widerstand des Drahtes ist dabei eine intrinsische, temperaturabhängige Materialkonstante und wird zusammen mit dem gemessenen Widerstand zur Berechnung der Temperatur verwendet. Die Geräte haben eine Box-Optik („Box Mods“) und neben der üblichen Watte wurden als Liquidträger Bambusfasern, Edelstahlseile und Keramikleiter eingeführt (75). Die folgende Abbildung 7 stellt die vier Generationen der elektronischen Zigaretten graphisch dar.



Abbildung 7: Die vier Generationen der e-Zigarette modifiziert nach (76) – dargestellt sind die typischen optischen Merkmale der technischen Entwicklung von elektronischen Zigaretten

Das Sortiment der sogenannten Heat-No-Burn-Produkte hat sich seit dem ersten Patent stark verändert und wird auch in Zukunft kontinuierlich ausgeweitet und optimiert werden. Eine weitere mögliche jedoch unspezifische Einteilung der Verdampfer ist die Kategorisierung in MTL- (*mouth to lung*) und DTL- (*direct to lung*) Modelle. Diese Einteilung erfolgt prinzipiell aufgrund von Unterschieden im Zugwiderstand. Alle bisher beschriebenen Verdampfer funktionieren nach dem MTL-Modell. Das Liquid wird in einen Tank gefüllt und über die Erwärmung der Heizspirale durch einen großen Zugwiderstand zum Verdampfen gebracht. Es wird das Rauchen einer Tabakzigarette imitiert, indem das Aerosol zuerst in den Mund gezogen und anschließend in die Lunge inhaliert wird. Die DTL-Modelle haben einen geringeren Zugwiderstand durch Verkürzen der Mundstücke und Vergrößern des Innendurchmessers, somit wird das direkte Inhalieren in die Lunge ermöglicht (77). Die von elektronischen Zigaretten gebildeten Aerosole weisen einen lungengängigen Partikeldurchmesser auf. Dies konnten bereits mehrere Studien aufzeigen. In einer Studie von Sundahl *et al.* konnte gezeigt

werden, dass 13 unterschiedliche e-Zigaretten ein nicotinhaltiges Aerosol mit einem MMAD im Bereich von 0,5 – 0,9 µm erzeugen und dass 75 - 90% dieser Partikel wieder ausgeatmet werden (78). Andere Untersuchungen ergaben geschätzte prozentuale Anteile von Partikeln in den tracheobronchialen und bronchoalveolären Regionen von 50,4 – 54,1% bzw. 7,3 – 30,6% (79). Eine weitere Studie dokumentiert einen MMAD zwischen 0,25 und 0,45 µm anhand zweier kommerzieller Geräte und einem nicotinfreien Basisliquid (80). Die Verdampfung von Basisliquid bzw. deren Bestandteilen ohne Zusatzstoffe ermittelte Partikelgrößen von Aerosolen aus reinem Propylenglycol (MMAD = 0,55 µm (81); 0,16 µm (79) bzw. 0,20 µm (82)), reinem Glycerin (MMAD = 0,42 µm (81); 0,21 µm (79) bzw. 0,35 µm (82)) und einer Mischung aus beiden Bestandteilen zu 50% (MMAD = 0,34 µm (81); 0,18 µm (79) bzw. 0,28 µm (82)) in diversen Studien. Trotz unterschiedlicher Versuchsparemeter liegen die MMAD-Werte alle im lungengängigen Bereich von >1 µm und erreichen somit die unteren Atemwege. Diese Aerosole haben demnach vergleichbare bzw. kleinere Partikeldurchmesser als die bereits beschriebenen Aerosole der medizinisch zugelassenen Inhalatoren.

#### 2.1.3.2 Grenzen und bedenkliche Gesundheitsaspekte der e-Zigarette

Mit stetiger technologischer Entwicklung der e-Zigaretten stieg auch die Anzahl der wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Publikationen zu diesem Thema. Die Komplexität dieser Produkte bietet zahlreiche Themengebiete, die für den Anwender nach Markteinführung umstritten und nicht reguliert waren. Nicht wissenschaftliche Publikationen mit ähnlichen Titeln wie „Gesundes Rauchen“ oder „Gesunde Alternative zur Zigarette“ täuschten Konsumenten und gaben den Eindruck eines völlig sicheren Verdampfungssystems. Es manifestierte sich die allgemeine Wahrnehmung die elektronische Zigarette könnte zur Rauchentwöhnung beitragen, da nicotinfreie Liquids nur die Rauchgewohnheiten wie Bewegungsabläufe reproduzieren sollten. Allerdings bildet sie in der Realität ebenso eine Alternative zur Verbrennungszigarette bzw. dient als Einstieg zum Konsum von nicotinhaltigen und –freien Produkten (70). Bereits die Bestandteile der meisten Basisliquids, Propylenglycol und Glycerin, wurden aufgrund ihres ubiquitären Einsatzes gewählt, welcher begründet liegt in der Einstufung als unbedenklicher Lebensmittelzusatzstoff befreit von Beschränkungen einer täglichen Einnahme von der *Food and Drug Administration* (FDA) in den Vereinigten Staaten und allgemein als sicher anerkannt (GRAS). Diese Deklaration richtet sich jedoch auf eine perorale Einnahme und es ist dringend davon abzuraten, die inhalierte Applikation von GRAS-Substanzen als unbedenklich einzustufen. Die Inhalation führt direkt in der Lunge zu einer schnellen Absorption ins Blut über das Umgehen des *First-Pass*-Effektes. Diese zwei Applikationswege können nicht miteinander verglichen werden. Propylenglycol und Glycerin werden in unterschiedlichen Anteilen in den Liquids eingesetzt,

dadurch ist eine Einstellung einer gewünschten Viskosität möglich. In älteren Modellen der e-Zigarette führte eine geringere Viskosität zur unkontrollierten Entleerung des Tanks, wobei eine zu hohe Viskosität ein Trockenlaufen des Verdampfers verursachte. Diese Tatsache konnte durch Zugabe von Wasser als Viskositätsregler kontrollierbar gemacht werden. Die beiden Trägerstoffe erzeugen durch Erhöhung der Aerosoldichte den Anschein einer Rauchwolke, die aufgrund ihrer hygroskopischen Eigenschaft eine zusätzliche Anreicherung von Feuchtigkeit bewirkt. Eine wissenschaftlich fundierte Suche nach einer toxikologisch unbedenklichen Transporter- und Trägersubstanz fand demnach vor der Markteinführung nicht statt (75). In zugelassenen Arzneimitteln zur pulmonalen Inhalation werden diese beiden Hilfsstoffe ebenfalls verwendet, allerdings besteht die Applikation hierbei nicht in einer elektrothermischen Behandlung des Arzneimittels. Wie die schrittweise rechtliche Beurteilung dieser neuen Produkte, gab es ebenfalls eine Entwicklung in der Methodik der Untersuchungen. Die Vergleichbarkeit ist aufgrund der Vielfalt an Variablen schwierig und führt oft zu irreführenden, sogar widersprechenden Aussagen. In einigen Aspekten konnten die standardisierten Untersuchungsmethoden der konventionellen Zigarette übernommen werden, jedoch nicht ohne Modifizierungen. Um das erzeugte Aerosol analysieren zu können, muss es vor allem reproduzierbar manuell oder automatisiert und standardisiert erzeugt und in einem geeigneten System gesammelt werden. Die Untersuchungsmethoden sind jedoch noch nicht endgültig, ausreichend entwickelt und werden auch weiterhin Gegenstand der Forschung sein müssen (83). Prinzipiell zeigen jedoch die meisten Studien, dass die Art und Menge der gebildeten Schadstoffe stark von der Leistung der e-Zigarette, der Zusammensetzung des Liquids und dem Verhalten des Anwenders abhängt. In einer Studie von Hutzler *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Verbrauch einer vollständigen Tankfüllung zu zwei Dritteln eine verstärkte Bildung von Carbonyl-Verbindungen, wie Formaldehyd, Acetaldehyd und Acrolein verursacht. Damit scheint die Bildung von Aldehyden mit niedrigen Liquidständen in den Tanks zu korrelieren. Während der ersten 50 Züge lagen die Werte weit unter 1 µg/ Zug, stiegen jedoch zwischen 50 und 100 Zügen exponentiell auf zum Teil über 5 µg/ Zug an. Deren Begründung scheinen fehlende Sicherheitsvorkehrungen zur Aufrechterhaltung konstanter Temperaturen während der Züge zu sein, die zur Überhitzung des Heizelementes aufgrund eines erhöhten Luftstromes führen (84). Diese These konnte eine Untersuchung von Cancelada *et al.* bestätigen. Je geringer der Widerstand, desto schneller die Wärmeübertragung und desto größer und dichter die Aerosolwolke. Jedoch konnte experimentell gezeigt werden, dass die Lüftungsöffnung der e-Zigarette einen erheblichen Einfluss auf die Bildung von Carbonyl-Verbindungen hat. Bei geschlossener Luftzufuhr und geringem Zugvolumen (50 mL) wurde die höchste Konzentration an Formaldehyd (48 ng/mg Aerosol) gemessen (85). Andere Studien wiederum berichten von einer stark aromenspezifischen Bildung von Carbonyl-Verbindungen (86). Eine steigende Anzahl und Konzentration an Aromen in nicotinhaltigen und nicotinfreien Liquids korreliert direkt mit pulmonalen

toxikologischen Reaktionen in bronchialen und alveolaren Schleimhautmodellen (87). Aber auch nicotin- und aromenfreie Liquids sind eine Quelle für Zersetzungsprodukte. So konnte eine Korrelation zwischen einer steigenden Temperatur der Heizspule und der Masse an niedermolekularen Carbonyl-Verbindungen gefunden werden. Dabei stieg die Temperatur (120 - 320°C) nicht nur über die Erhöhung der Leistung (Watt), sondern ebenfalls über die Anzahl der Züge. Es konnten starke Variationen in den Konzentrationen an Formaldehyd (16,5 – 1000 ng/ Zug) und Acetaldehyd (35,9 – 119,2 ng/ Zug) je nach Leistung ermittelt werden. Außerdem wurde untersucht, dass eine trockene Heizspule bereits bei 25 Watt eine Temperatur von 950°C erreichen kann (88). In einer Studie von Chen *et al.* konnten sogar Temperaturen zwischen 322 und 1008°C bei trockenen Heizspulen, 145 – 334°C bei halber Tankfüllung und 110 – 185°C bei vollständiger Tankfüllung je nach Dauer der Züge anhand von reinem Propylenglycol dokumentiert werden (89). Diese Beobachtungen stimmen mit den bereits erwähnten Ergebnissen von Hutzler *et al.* überein. Kosmider *et al.* konnten bestätigen, dass eine Erhöhung der Spannung von 3,2 auf 4,8 Volt zu einem über 200-fachen Anstieg der bereits erwähnten niedermolekularen Carbonyl-Verbindungen führte (90). Weitere Studien dokumentierten eine Bildung von Acrolein, Formaldehyd und Acetaldehyd bei reinen Basisliquidmischungen in unterschiedlichen prozentualen Zusammensetzungen ohne Zusatzstoffe (91–95). Eine temperaturabhängige, positive Korrelation zwischen dem steigenden prozentualen Anteil von Propylenglycol in einem Basisliquid und der erhöhten Bildung von freien Radikalen nach Bedampfen konnte ebenfalls in Publikationen beschrieben werden (96). In einer Studie von Jin *et al.* konnte im Mausmodell eine Reizung der Lunge und endotheliale Dysfunktion durch die Bildung von Acetaldehyd und Formaldehyd aus Basisliquid nachgewiesen werden (97). Diese Verbindungen können ein potentielles gesundheitsschädliches Risikopotential darstellen, welches nicotinhaltige und nicotinfreie Liquids betrifft, da sie hauptsächlich durch Oxidation der Vernebelungsmittel Glycerin und Propylenglycol entstehen. Andererseits konnten keine akuten signifikanten Veränderungen der Herzfrequenz, des Blutdruckes und der Endothelfunktion an 16 Nichtraucher nach Inhalation eines nicotinfreien Liquids festgestellt werden (98). Eine Studie von Chaumont *et al.* an 25 Probanden konnte ebenfalls keine Veränderungen von kardiovaskulären Parametern sowie oxidativem Stress bei Anwendung eines Basisliquids im Vergleich zur Kontrolle im Gegensatz zum nicotinhaltigen Liquid nachweisen (99). Weitere Studien konnten ebenfalls keine akuten Nebenwirkungen nach Anwendung eines reinen Basisliquids auf die Lungenfunktion feststellen (7). In einer Publikation von Ween *et al.* wurden die Auswirkungen der Bestandteile von e-Zigaretten-Aerosolen auf alveoläre Makrophagen untersucht. Die phagozytäre Dysfunktion, die Expression phagozytärer Erkennungsrezeptoren und die Zytokinsekretion konnte allerdings nur mit nicotin- und aromenhaltigen Liquids assoziiert werden (100).

Aber auch andere potentiell toxische Gefahrenquellen konnten bereits ermittelt werden. Der Konsum von e-Zigaretten ist eine potenzielle Quelle für die Exposition gegenüber Metallen und Metalloiden.

Dies bezieht sich nicht nur auf das Aerosol, sondern bereits auf kommerzielle Liquids vor der Befüllung der Geräte. So konnten beispielsweise toxische Konzentrationen von Metallen analysiert werden, die um drei (Blei), vier (Chrom), fünf (Kupfer) und 20 (Nickel) Größenordnungen höher waren als die erlaubten Grenzkonzentrationen aus dem Arzneibuch der Vereinigten Staaten von Amerika (*United States Pharmacopeia*, USP). Die Gründe hierfür können vielfältig sein und umfassen eine fehlende gesetzliche Regulierung, fehlende Qualitätskontrollen der Hersteller und Lieferanten von Inhaltsstoffen, Primärverpackungen und Lagerstabilitäten (101, 102). Aber auch in den Aerosolen konnten bis zu 35 Metalle nachgewiesen werden, dabei dominierte Silicium in allen Versuchsansätzen. Mögliche Quellen sind Glühfäden (Nickel, Chrom), Drähte (Silber, Kupfer), Messingklemmen (Kupfer, Zink), Lötstellen (Zinn, Blei), Dochte und Ummantelungen (Silicium, Calcium, Magnesium, Aluminium) (103–105). Die Zugabe bestimmter Aromastoffe ist mittlerweile verboten, dennoch werden diese regelmäßig detektiert. Die Deklaration von eingesetzten Aromen und ihren Konzentrationen in Liquids ist allerdings sehr ungenügend. In weiteren Publikationen werden Substanzen identifiziert und quantifiziert, die dosisabhängige zytotoxische Effekte verursachen können. Zu diesen Stoffen gehören u.a. Zimtaldehyd, Benzylalkohol, *p*-Anisaldehyd, Benzaldehyd, Maltol und Menthon. Sie können das Lungengewebe schädigen, indem sie oxidativen Stress und Entzündungsreaktionen auslösen (106–110). Es wird angenommen, dass die Zytotoxizität von Liquids stark von ihren Aromastoffen abhängt. Dies liegt auch aber nicht ausschließlich an der komplexen molekularen Vielfalt und der damit einhergehenden großen experimentellen Herausforderung (111). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass alle vier Generationen der elektronischen Zigaretten lungengängige Partikel der Größe PM<sub>1</sub> und kleiner produzieren und somit ein erhebliches Potential an passivem Konsum besteht, dabei stieg die Menge der Partikel bei leistungsfähigeren Modellen erheblich (112). Bislang gibt es jedoch keinen Hinweis auf Schädigungen durch Passivdampf. In einer Studie zur Untersuchung der exhalieren Atemluft von 17 Konsumenten von e-Zigaretten konnten zwar nachweisbare aber keine gesundheitsschädlichen Konzentrationen an Nicotin, Propylenglycol, tabakspezifischen Nitrosaminen und Kupfer ermittelt werden (113). Der passive Konsum von Aerosolen hängt stark von der Belüftungsrate, dem Zugverhalten der Konsumenten und den räumlichen Begebenheiten ab (114). Die vorgestellten variablen Parameter führen zu komplexen Ergebnissen, die allmählich mit der wachsenden Vielzahl an wissenschaftlich fundierten Publikationen vereinheitlicht werden können. Im Vergleich zum Tabakrauchen besteht der Konsum von e-Zigaretten in der Inhalation von verbrennungsfrei erzeugten Aerosolen. Bislang wurde nur vom Vereinten Königreich offiziell der Konsum positiv kommuniziert. Ein Bericht des britischen Gesundheitsministeriums schätzte die Anwendung von e-Zigaretten zu etwa 95% weniger schädlich gegenüber dem Tabakrauchen ein (115). Diese Einschätzung wurde im Oktober 2020 von der Cochrane Collaboration bestätigt, jedoch explizit als nicht risikofrei bezeichnet (116).

### 2.1.3.3 Technologie der e-Zigarette als Medizinprodukt

Das mögliche Ziel dieser Arbeit ist die Deklaration einer bereits bestehenden inhalativen Technologie zu einem Medizinprodukt. Die Definition eines Medizinproduktes ist folgend:

„Medizinprodukte sind Produkte mit medizinischer Zweckbestimmung, die vom Hersteller für die Anwendung beim Menschen bestimmt sind. [...] Anders als bei Arzneimitteln, die pharmakologisch, immunologisch oder metabolisch wirken, wird die bestimmungsgemäße Hauptwirkung bei Medizinprodukten primär auf physikalischem Weg erreicht.“ (117) (Medizinproduktegesetz, MPG)

Die Anforderung für das Inverkehrbringen eines Medizinproduktes ist die Anmeldung und Risikoklassifizierung sowie die CE-Kennzeichnung des Herstellers, die eine lückenlose Konformität bzw. Sicherheit, medizinisch-technische Leistungsfähigkeit und den Nutzen mit den gesetzlichen Bestimmungen dokumentiert und garantiert (118, 119). Diese grundlegenden Anforderungen müssen in einem Konformitätsbewertungsverfahren abhängig von der Risikoklasse durch eine unabhängige Prüf- und Zertifizierungsstelle (Benannte Stelle) nachgewiesen und laufend in Form eines Vigilanzsystems dokumentiert werden. Zudem sind umfangreiche Untersuchungen in Form von Qualifizierungen, Validierungen und klinischen Studien notwendig. Zusammenfassend muss der Hersteller ein spezielles, sehr umfangreiches Qualitätsmanagementsystem etablieren. Die Einteilung in Risikoklassen erfolgt nach dem potentiellen Schaden am menschlichen Körper, den das Medizinprodukt verursachen könnte. Dieser wird aufgrund von Kriterien wie z.B. Behandlungsdauer, Behandlungsort und Invasivitätsgrad bewertet. Eine externe Bewertung über diese rechtliche Fragestellung wurde über die Kanzlei Neumüller & Partner mbB (Fachanwälte für Medizinrecht) in Auftrag gegeben. Die Technologie der e-Zigarette als Applikator zum Verdampfen von Arzneimitteln ist den Medizinprodukte-EU-Richtlinien zufolge einzuteilen in die Risikoklasse 2a des Medizinproduktegesetzes als aktives, invasives Medizinprodukt. Diese Einteilung ist begründet im mäßigen Anwendungsrisiko und der vorübergehenden Anwendung am Körper. Die e-Zigarette verfügt bereits über eine CE-Kennzeichnung, somit wäre der nachfolgende Schritt ein Bewertungsverfahren einer Prüf- und Zertifizierungsstelle benannt durch die Zentralstelle der Länder für Gesundheitsschutz bei Arzneimitteln und Medizinprodukten (ZLG), welches der Hersteller beantragen muss (120). Zu beachten ist hierbei, dass nur die Technologie der e-Zigarette als Medizinprodukt verwendet werden soll. Diese Abgrenzung zur e-Zigarette als Gebrauchsgegenstand zur Applikation von Genussmitteln ist zwingend notwendig, da das Produkt nach allgemeiner Betrachtung keinen Gesundheitsbezug aufweist. Hierfür muss aufgrund der Verpackung und der Bedienungsanleitung ersichtlich sein, dass es sich um ein Produkt zur Prävention oder Heilung von Krankheiten handelt. Wie bereits in Kapitel 2.1.2 Technologien zur Inhalation von Substanzen erwähnt, befinden sich unterschiedliche Inhalationstypen als Medizinprodukte auf dem Markt: Dosierinhalatoren, Pulverinhalatoren und Vernebler. Die

e-Zigarette wäre theoretisch neben Düsen-, Ultraschall- und Membranverneblern der Gruppe der Vernebler zuzuordnen. Die Vernebler zeichnen sich dadurch aus, dass der Gebrauch einen bestimmten Aufwand erfordert, aufgrund der Größe der Geräte und der benötigten externen Energiequelle. Die e-Zigarette kann die Gruppe der Vernebler um eine handliche mobile Applikationsart und ein neues Verdampfungsprinzip erweitern. Der Patient könnte das zu verdampfende Arzneimittel in den Tank füllen und ohne Einschränkungen inhalieren. Die Technologie von elektronischen Zigaretten arbeitet auf der Basis elektrothermischer Erhitzung einer Flüssigkeit (Liquid), die durch Kapillarwirkung des Trägermaterials in den Verdampferkopf gelangt, dort bis zum Siedepunkt erhitzt wird und zu feinem Dampf (Aerosol) expandiert. Im Wesentlichen bestehen alle e-Zigaretten aus der Stromquelle, dem elektrischen Vernebler, einer auswechselbaren Kartusche mit einer Flüssigkeit (Liquid) und der Steuerungselektronik (121). Prinzipiell muss bei dieser Technologie ein Trockenlaufen der Heizwendel verhindert werden. Dieser sogenannte Dry-Hit Effekt kann durch mechanische Defekte oder unzureichende Füllstände der Tanks verursacht werden. Ebenfalls kann eine zu hohe Viskosität des Liquids zu einem Abriss des Nachflusses zur Heizwendel und zur Bildung potentiell toxischer Substanzen führen. Dieser Tatsache kann durch Zugabe des Viskositätsreglers Wasser entgegengewirkt werden. Dennoch muss die technische Umsetzung bestimmten Sicherheitsstandards unterliegen und dementsprechend geprüft bzw. anders konzipiert werden.

## 2.2 Modellsubstanzen als Wirkstoffe in Liquids

Im Folgenden sollen die in dem experimentellen Teil dieser Arbeit verwendeten Modellsubstanzen erklärt und charakterisiert werden. Sie dienen zur Veranschaulichung und Erkenntnisgewinnung im Verhalten ihrer Aerosolerzeugung mithilfe elektronischer Zigaretten und sollten im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Es handelt sich um Substanzen, die größtenteils oder ausschließlich inhalativ angewandt werden. Inwieweit die ermittelten Ergebnisse auf eine generelle Formulierung einer medizinischen Anwendung übertragen werden können, war nicht Gegenstand der Untersuchungen.

### 2.2.1 Ätherische Öle

Ätherische Öle enthalten sekundäre Metabolite von Pflanzen mit vielfältigen biologischen Eigenschaften. Ihre ökologischen Funktionen sind überwiegend die Abwehr von Fressfeinden, das Anlocken der natürlichen Feinde ihrer Fressfeinde oder ihr antimikrobieller Schutz vor Keimen, aber auch das Anlocken von Insekten zur eigenen Bestäubung (122). Die chemische Charakterisierung spielt dabei für das Verständnis dieser Eigenschaften eine entscheidende Rolle, denn die Komplexität dieser heterogenen Vielstoffsysteme ist immer die Summe ihrer Komponenten. Ein Pionier in der Strukturaufklärung und Synthese von Terpenen, dem Hauptbestandteil der ätherischen Öle, war Otto Wallach (1847 – 1931). Er erkannte die Isoprenregel (Abbildung 8), die empirische Regel von vielen Naturstoffen als Polymere des Isoprens.

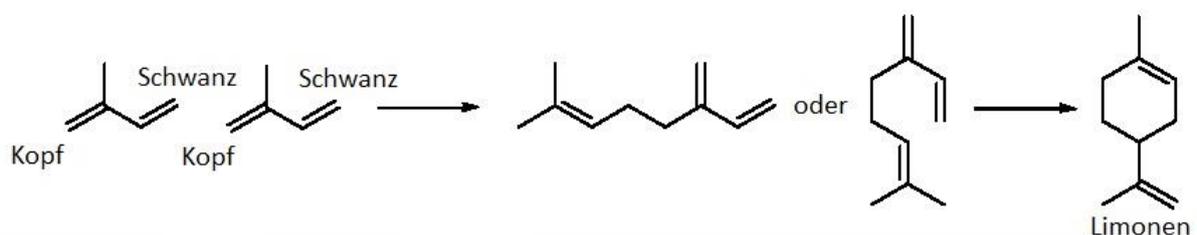
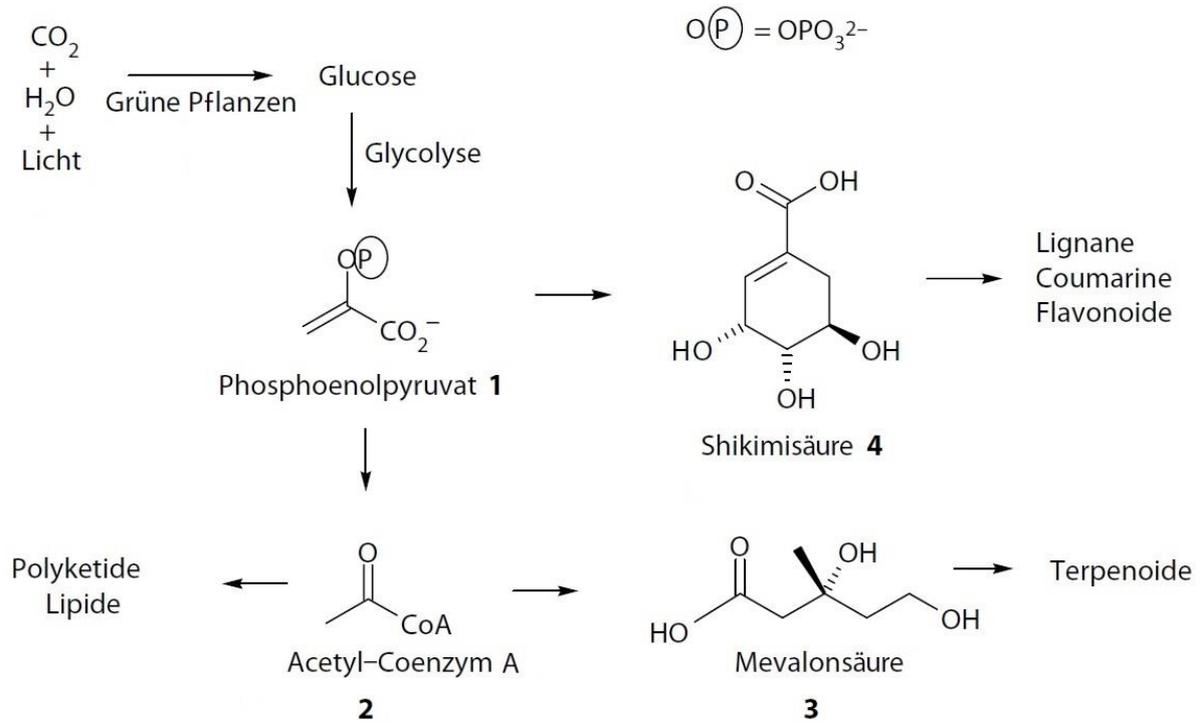


Abbildung 8: Isoprenregel nach Wallach modifiziert nach (123) – dargestellt ist die Kopf-Schwanz-Kopplung zweier Isopren-Moleküle zu einem Molekül Limonen

Ätherische Öle sind Destillationsgemische aus überwiegend niedermolekularen chemischen Substanzen. Die häufigste Methode zur Extraktion der ätherischen Öle ist die erschöpfende Destillation durch Wasserdampf der entsprechenden Pflanzenteile, aber auch das Kaltpressen kommt z.B. bei Schalenölen zum Einsatz (124). Diese Formen der Extraktion geben allerdings nur bedingt eine exakte Nachbildung der ätherischen Öle in der Pflanze wieder. Denn sowohl beim Kaltpressen, durch Vermischen mit anderen Pflanzensäften, als auch bei der Destillation kommt es zur Modifikation des chemischen Profils durch Interaktionen, wie Oxidationen, Zersetzung von Aldehyden und Säuren, Bildung von Estern und Lösung von hydrophilen Bestandteilen im Lösungsmittel. Aufgrund dessen wird das gewonnene rohe ätherische Öl soweit aufgearbeitet und einer Reihe von Prozessen unterzogen bis die vorgegebenen Spezifikationen zur Erhöhung der Reinheit eingehalten werden. Von technischem und pharmazeutischem Interesse sind Pflanzenteile, die 0,01 – 10% ätherisches Öl beinhalten. Die Speicherstrukturen der ätherischen Öle in der Pflanze können sekretorische Idioblasten (Sekretionszellen), extrazelluläre Hohlräume oder Trichome sein. Phytochemische Polymorphismen sind nicht nur zwischen verschiedenen Spezies derselben Gattung wahrscheinlich, sondern auch innerhalb einer Pflanze zwischen unterschiedlichen Pflanzenteilen möglich. Auch abiotische Umweltfaktoren haben einen Einfluss auf die Zusammensetzung eines ätherischen Öls, so entscheiden oft die Anbau- und Erntebedingungen über prozentuale Verhältnisse (122).

Die Biosynthese von sekundären Metaboliten leitet sich von wenigen Biosynthesewegen des Primärstoffwechsels ab, der im Gegensatz zum Sekundärstoffwechsel für das Überleben eines Organismus essenziell ist. Die Biosynthese beginnt bei grünen Pflanzen (Abbildung 9) mit der Photosynthese, der Umwandlung von Kohlendioxid und Wasser in Glucose und der anschließenden Glycolyse zu Phosphoenolpyruvat (**1**), ein wichtiger Baustein für Shikimate. Durch Decarboxylierung von Phosphoenolpyruvat entsteht Acetat, das mit Coenzym-A (CoA) zu Acetyl-CoA (**2**) verestert wird. Eine Selbstkondensation führt zu den Polyketiden und Lipiden. Acetyl-CoA ist auch ein Ausgangspunkt für die Synthese von Mevalonsäure (**3**), die das wichtigste Ausgangsmaterial für die Terpenoide ist.

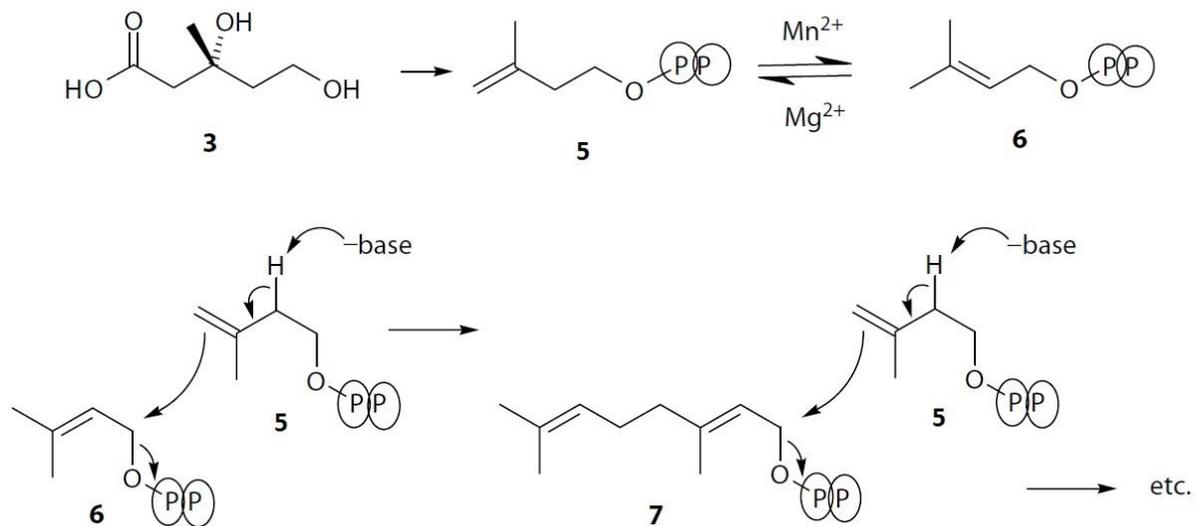
Die drei dargestellten Routen führen alle zu der Biosynthese von Bestandteilen ätherischer Öle, die Terpene sind allerdings die bei weitem wichtigste Gruppe.



**Abbildung 9: Biosynthese von sekundären Metaboliten modifiziert nach (122)** – dargestellt ist die Photosynthese und anschließende Glycolyse zu Phosphoenolpyruvat (1), ein wichtiger Baustein der Shikimisäure (4). Durch Decarboxylierung von Phosphoenolpyruvat entsteht Acetyl-CoA (2), dem Ausgangspunkt der Synthese von Mevalonsäure (3).

Terpenoide werden als Substanzen definiert, die aus Isopren (2-Methylbutadien)-Einheiten bestehen. Die Kopplung erfolgt in der Regel in eine Richtung, die so genannte Kopf-Schwanz-Kopplung, wobei die Isopropyl-Gruppe als Kopf des Moleküls bezeichnet wird.

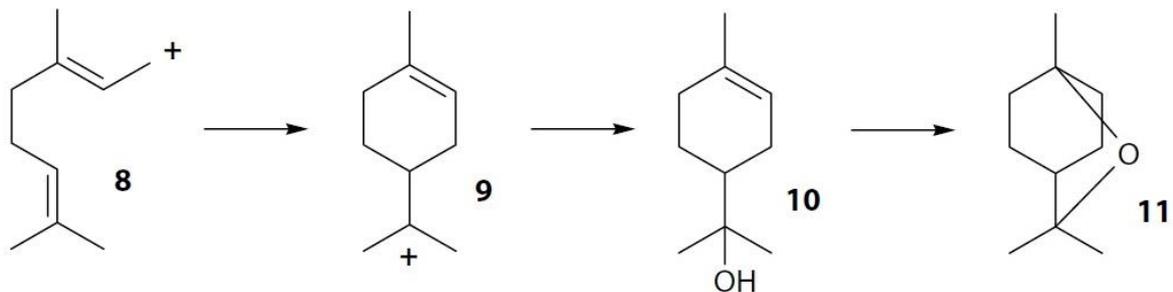
In der Abbildung 10 ist die Biosynthese der Terpenoide dargestellt. Durch die Phosphorylierung von Mevalonsäure (**3**) und Abspaltung des tertiären Alkohols bei gleichzeitiger Decarboxylierung der benachbarten Säuregruppe entsteht Isopentenylpyrophosphat IPP (**5**). Eine Isomerisierung führt zum Dimethylallylpyrophosphat DMADP (**6**).



**Abbildung 10: Biosynthese von Terpenoiden adaptiert von (122)** – dargestellt ist die Phosphorylierung der Mevalonsäure (**3**) zu Isopentenylpyrophosphat (**5**). Durch Isomerisierung wird Dimethylallylpyrophosphat (**6**) hergestellt und nach einer Koppelung zweier Moleküle entsteht das Geranylpyrophosphat (**7**).

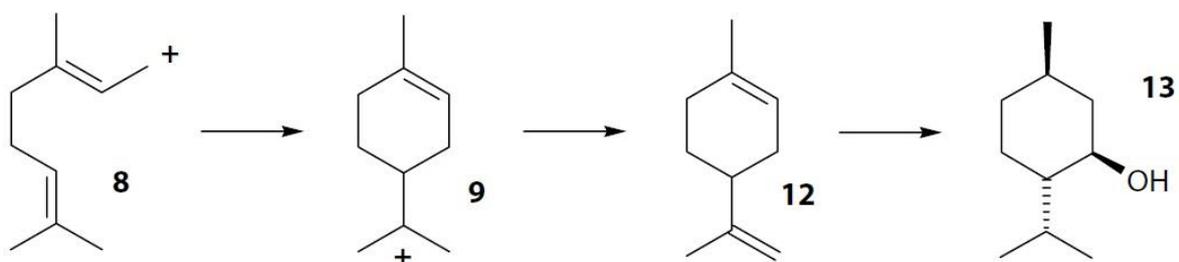
Die Kopplung dieser beiden 5-Kohlenstoff-Einheiten ergibt eine 10-Kohlenstoff-Einheit, das Geranylpyrophosphat (**7**). Dieses Molekül lässt sich durch weitere Additionen von IPP-Einheiten (**5**) zu 15-, 20-, 25- und mehr Kohlenstoffeinheiten erweitern. Terpenoide enthalten demnach immer ein Vielfaches von fünf Kohlenstoffatomen. Historisch bedingt wird die Struktur des Geranylpyrophosphats als Monoterpenoid bezeichnet. Diese Nomenklatur wurde beibehalten, so dass die Terpenoide mit fünf Kohlenstoffatomen als Hemiterpenoide, die mit 15 C-Atomen als Sesquiterpenoide und die mit 20 C-Atomen als Diterpenoide bezeichnet werden. Eine hinreichende Volatilität für ätherische Öle besteht nur bei Hemi-, Mono- und Sesquiterpenoiden, allerdings kommen auch Abbauprodukte höherer Terpenoide in ätherischen Ölen vor. Es gilt demnach, mit Zunahme der Kohlenstoffatome erhöhen sich die Siedepunkte der Terpenoide und sie weisen eine geringere relative Flüchtigkeit auf. Daher tragen sie prozentual gesehen weniger zum Geruch des jeweiligen ätherischen Öls bei, können aber trotzdem bei niedrigeren Geruchsschwellen entscheidend zur Charakteristik der olfaktorischen Endnote beitragen.

Der Hauptbestandteil des Eucalyptusöls ist mit mindestens 70% das 1,8-Cineol (125). Die Biosynthese des 1,8-Cineols (Abbildung 11) beginnt mit dem Vorläufer für die Monoterpenoide, dem Geranylpyrophosphat. Durch Heterolyse seiner Kohlenstoff-Sauerstoff-Bindung entsteht das Geranylcarbokation (**8**) und die dargestellte intramolekulare elektrophile Additionsreaktion ergibt das monozyklische Carbokation,  $\alpha$ -Terpinylkation (**9**). Die Reaktion mit Wasser führt zum  $\alpha$ -Terpineol (**10**) und nach anschließender nukleophiler Addition der Hydroxy-Gruppe an die Kohlenstoff-Doppelbindung entsteht das 1,8-Cineol (**11**).



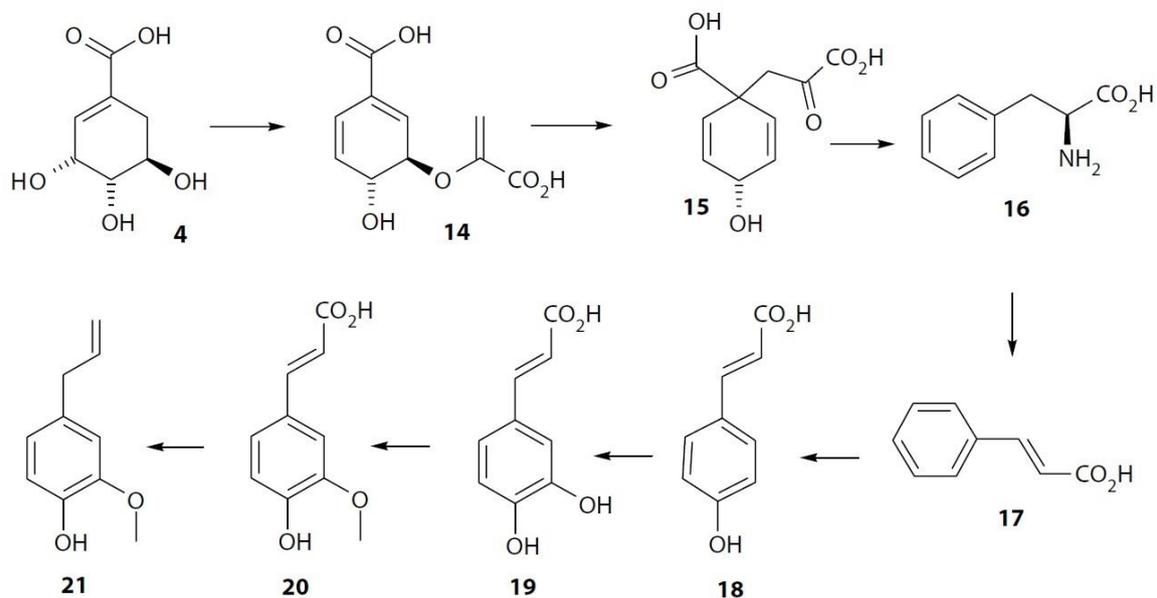
**Abbildung 11: Biosynthese von 1,8-Cineol modifiziert nach (122)** – dargestellt ist die intramolekulare elektrophile Additionsreaktion des Geranylcarbokation (**8**) zum  $\alpha$ -Terpinylkation (**9**) und anschließender Hydratisierung zu  $\alpha$ -Terpineol (**10**). Das 1,8-Cineol (**11**) entsteht nach einer nukleophilen Addition der Hydroxy-Gruppe an die Kohlenstoff-Doppelbindung.

Das ätherische Öl Minzöl muss nach Europäischem Arzneibuch zu mindestens 42% aus freien Alkoholen bestehen und einen Gehalt an Ketonen zwischen 25 – 40% aufweisen (125). Die freien Alkohole werden berechnet als (-)-Menthol, die chemische Hauptkomponente des Öls. Die Biosynthese des Menthols ist in der Abbildung 12 dargestellt. Der Syntheseweg bis zum  $\alpha$ -Terpinylkation (**9**) stimmt mit der Biosynthese des 1,8-Cineols überein. Nach Abspaltung eines Protons entsteht das Limonen (**12**). Die Hydroxylierung führt über mehrere Zwischenprodukte zum (-)-Menthol (**13**).



**Abbildung 12: Biosynthese von (-)-Menthol modifiziert nach (122)** – dargestellt ist die intramolekulare elektrophile Additionsreaktion des Geranylcarbokation (**8**) zum  $\alpha$ -Terpinylkation (**9**) und anschließender Abspaltung eines Protons zu Limonen (**12**). Das (-)-Menthol (**13**) entsteht durch Hydroxylierung über mehrere Zwischenprodukte.

Das Eugenol wird in Pflanzen über den Shikimisäure-Weg (Abbildung 13) synthetisiert. Die Shikimisäure (**4**) entsteht aus Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat. Durch Abspaltung eines der Ringalkohole und erneuter Reaktion mit Phosphoenolpyruvat entsteht Chorismasäure (**14**), die zur Vorphenensäure (**15**) umgesetzt werden kann. Eine Decarboxylierung und Abspaltung des Ringalkohols bilden das Phenylpropionsäuregerüst. Die Aminierung und Reduktion der Ketonfunktion führen zur Herstellung der essentiellen Aminosäure Phenylalanin (**16**), im Weiteren führen Reduktion und Eliminierung zur Bildung von Zimtsäure (**17**). Die *p*-Cumarsäure (**18**) und die anschließende Bildung der Kaffeesäure (**19**) entstehen aufgrund von Ringhydroxylierung der Zimtsäure. Durch Methylierung wird die Kaffeesäure zur Ferulasäure (**20**) umgesetzt. Das Eugenol (**21**) entsteht letztendlich über die Reduktion der Seitenkette der Ferulasäure (**20**).



**Abbildung 13: Biosynthese von Eugenol modifiziert nach (122)** – dargestellt ist die Reaktion von Shikimisäure (4) und Phosphoenolpyruvat zu Chorismasäure (14), die zu Vorphenensäure (15) umgesetzt wird. Über weitere Reaktionen wird die Aminosäure Phenylalanin (16) gebildet, die weiterhin zur Zimtsäure (17) reagiert. Die *p*-Cumarsäure (18) und die anschließende Bildung der Kaffeesäure (19) entstehen aufgrund von Ringhydroxylierung. Durch Methylierung entsteht die Ferulasäure (20). Das Eugenol (21) wird durch die Reduktion der Seitenkette hergestellt.

Die pharmazeutischen Untersuchungen von ätherischen Ölen erfolgen meist über Identitäts- und Gehaltsbestimmungen nach den jeweiligen Arzneibüchern. Diese qualitativen und quantitativen Analysen basieren auf ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften und werden um ihre organoleptischen Eigenschaften ergänzt. Diese nicht messbare Bewertung von organoleptischen

Parametern über die Sensorik einer Person macht die starke Stimulierung des menschlichen Geschmacks- und Geruchssinns deutlich, die für jedes ätherische Öl charakteristisch ist und einen historischen Hintergrund aufweist. Trotzdem gelten für jede beabsichtigte Verwendung klar definierte Spezifikationen, die über angemessene Qualitätskontrollen geprüft werden müssen. Eine toxikologische Bewertung eines Naturproduktes auf Grundlage der chemischen Zusammensetzung und ihrer natürlichen Variabilität für einen vorgesehenen Verwendungszweck ist heutzutage validierbar. Sie beruht auf der Untersuchung der toxischen Dosis der einzelnen Bestandteile sowie einer ganzheitlichen Bewertung der Summe aller Bestandteile nach Priorisierung des Toxizitätspotentials und sollte immer in Zusammenhang gesetzt werden mit potentiellen Konzentrationen der Einnahme über Lebensmittel (122).

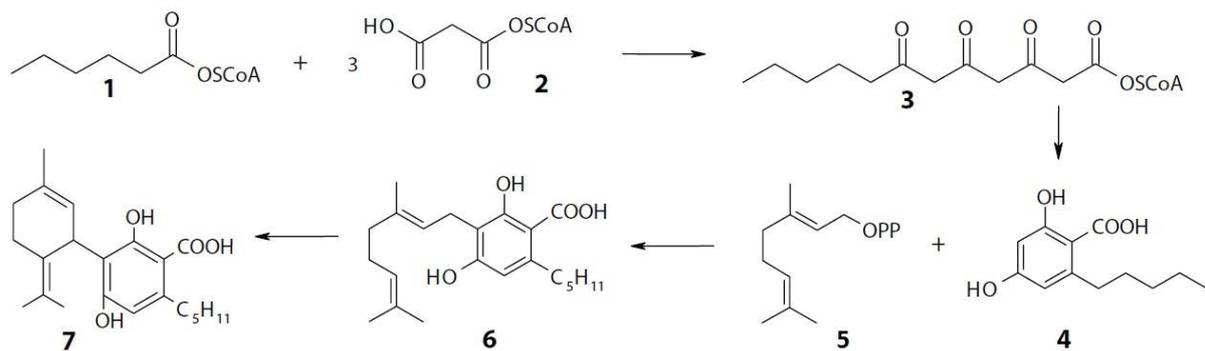
Die Wirkung der ätherischen Öle nach oraler, perkutaner oder inhalativer Applikation ist so vielfältig, wie ihre Zusammensetzung. Die wohl häufigste und bekannteste Anwendung ist die Inhalation. In niedrigen Konzentrationen beruht ihre Wirkung auf der Einlagerung in bestimmte Bereiche der Zellmembran und der Beeinflussung bestimmter Ionenkanäle, Rezeptoren oder Enzyme. Bei möglichen Überdosierungen kommt es zu unspezifischen Effekten durch Reizwirkungen (126). Ihre Resorption erfolgt im Allgemeinen sehr schnell und die metabolische Biotransformation hauptsächlich in der Leber zu hydrophileren Molekülen in zwei Kategorien: Phase I- und Phase II-Reaktionen. Die Stoffwechselprodukte werden innerhalb von 48 bis 72 h über den Urin ausgeschieden, etwa 10% der Öle aber auch über den Kot (127). In Phase I-Reaktionen erfolgen Oxidationen, aber auch Reduktionen und Hydrolysen über die enzymatische Aktivität von Cytochrom P450. In Phase II-Reaktionen können die Zwischenprodukte der Phase I zu Produkten mit hoher Hydrophilie durch Anlagerung bereits gut wasserlöslicher körpereigener Substanzen wie Zucker und Salze umgewandelt werden (128). So kann beispielsweise eine Metabolisierung von Menthol über das hydrophile Mentholglucuronid oder eine Metabolisierung von 1,8-Cineol über 2-Hydroxy-1,8-cineol bzw. 3-Hydroxy-1,8-cineol im Urin nachgewiesen werden. Diese beiden Hauptbestandteile der ätherischen Öle Minzöl und Eucalyptusöl werden bei Atemwegserkrankungen angewandt. Die Wirkung von Menthol beruht auf der Aktivierung des Kälterezeptors TRPM8. Der Ionenkanal TRPM8 ermöglicht den Eintritt von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in die Zelle, was zu einer Depolarisierung und der Erzeugung eines Aktionspotenzials führt (129). Das Signal wird weitergeleitet und führt schließlich zur Empfindung von Kälte und Kälteschmerz ohne tatsächlicher Absenkung der Temperatur. Dadurch vermittelt Menthol lokal anästhetische und reizlindernde Eigenschaften. Das Terpen 1,8-Cineol wirkt auf ähnliche Weise, allerdings ist der Ionenfluss langsamer und nimmt schneller ab verglichen mit Menthol (129). Beide Substanzen können die mukoziliäre Clearance, den Selbstreinigungsmechanismus der Bronchien, positiv beeinflussen und verbessern die Lungenfunktion (130). Sie haben eine antimikrobielle Wirkung durch Veränderung der Membranpermeabilität bakterieller Zellen (131). Die antiinflammatorische Wirkung von 1,8-Cineol

beruht auf der Hemmung entzündungsfördernder Zytokine über die Regulierung des NF-κB-Signalwegs (122). Diese Wirkungen machen diese beiden Substanzen aber auch ihre ätherischen Öle zu potentiellen Wirkstoffen einer Inhalationstherapie, die lokal am beabsichtigten Wirkort appliziert werden können (122). Der exakte Wirkungsmechanismus von Eugenol hingegen ist unbekannt. Es wird jedoch beschrieben, dass die schmerzlindernde Wirkung aufgrund der Unterbrechung von Aktionspotentialen eintritt. Eugenol ist außerdem in der Lage die eisenvermittelte Lipidperoxidation durch Komplexbildung mit reduzierten Metallen zu hemmen (132). Diese antioxidative Wirkung beruht auf der Unterbrechung der Kettenreaktion und dem Abfangen des aktiven Sauerstoffs. Die antibakterielle Wirkung gegenüber einer Vielzahl an Bakterien konnte aufgrund von Hemmung bakterieller Enzyme und der Destabilisierung bakterieller Membranen nachgewiesen werden (133–135). Weitere beschriebene entzündungshemmende Wirkungen leiten sich, ähnlich wie bei 1,8-Cineol, von der Hemmung entzündungsfördernder Zytokine über die Regulierung des NF-κB-Signalwegs ab. Diese traditionelle Anwendung in Form von Nelkenöl ist vor allem in der Zahnmedizin üblich (132).

### 2.2.2 Cannabidiol

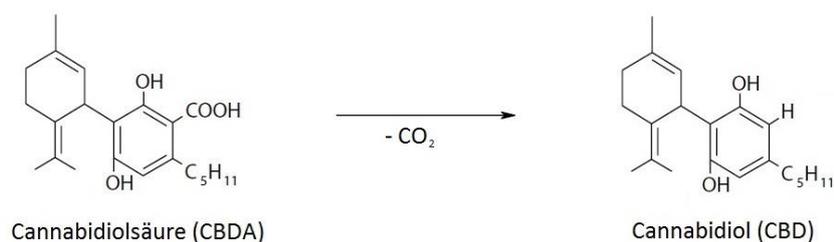
Die Cannabispflanze wurde schon in der Antike aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften genutzt. Seit der Entdeckung der Cannabinoide, der Transformationsprodukte einiger Terpenphenole, und ihrer teils psychoaktiven Wirkung ist die Verwendung von Cannabisblüten und ihre Legalität weltweit ein bleibendes aktuelles Thema. Die wichtigste Art der Gattung der Familie "Cannabaceae" ist die Pflanze *Cannabis sativa* L. Die höchste Konzentration an Cannabinoiden enthalten die Blüten. In haarähnlichen, klebrigen Trichomen von weiblichen Pflanzenblüten wird das cannabinoidhaltige viskose Harz produziert (136). Cannabidiol (CBD) und Cannabidiolsäure (CBDA) gehören zu einer Untergruppe der Phytocannabinoide und sind als nicht-psychoaktive Verbindungen von therapeutischem Interesse.

Die Biosynthese von Cannabinoiden führt über den Syntheseweg der Polyketide und ist in der Abbildung 14 dargestellt. Aus n-Hexanoyl-CoA (1) und drei Molekülen Malonyl-CoA (2) entsteht eine Polyketosäure (3), die durch die Aldol-Reaktion zur Olivetolsäure (4) reagiert. Cannabigerolsäure (6) entsteht durch Prenylierung von Olivetolsäure (4) mit Geranyldiphosphat (5). Die Umwandlung der Cannabigerolsäure (6) in Cannabidiolsäure (7) wird anschließend durch eine Cannabidiolsäuresynthase katalysiert (136).



**Abbildung 14: Biosynthese von Cannabidiolsäure modifiziert nach (137)** – dargestellt ist die Reaktion von n-Hexanoyl-CoA (1) und drei Molekülen Malonyl-CoA (2) zu Polyketosäure (3). Die Olivetolsäure (4) entsteht über die anschließende Aldol-Reaktion. Die Cannabigerolsäure (6) entsteht durch Prenylierung von Olivetolsäure (4) mit Geranyldiphosphat (5). Die Umwandlung der Cannabigerolsäure (6) in Cannabidiolsäure (7) wird über eine Cannabidiolsäuresynthase katalysiert.

Cannabidiol wurde erstmals im Jahr 1940 isoliert. CBDA, die carboxylierte Form von CBD, ist für den Menschen nicht pharmazeutisch aktiv und muss erst durch Decarboxylierung in das CBD umgewandelt werden (Abbildung 15) (138).



**Abbildung 15: Decarboxylierung von Cannabidiolsäure (CBDA) zu Cannabidiol (CBD) modifiziert nach (137)** – dargestellt ist die chemische Reaktion der Abspaltung eines Kohlenstoffdioxid-Moleküls

CBD ist die wichtigste Cannabinoid-Verbindung des Industriehanfs und gilt als vielversprechender medizinischer Wirkstoff zur Linderung von Symptomen vieler Krankheiten. Aktuelle Forschungen behaupten, dass sowohl neurologische Krankheiten wie Epilepsie, Parkinson, Huntington, Alzheimer, als auch Anorexie und Reizdarmsyndrom mit Veränderungen des Endocannabinoidspiegels verbunden sind und daher Cannabinoide wie CBD und Tetrahydrocannabinol (THC) zur Regulation von Gedächtnisschwächen, Appetit, Energiehaushalt und Schmerzen angewandt werden könnten (139). Die tägliche CBD-Gabe zeigte eine Verbesserung der motorischen Leistungen bei Parkinson-Patienten. Bei Epilepsie-Patienten im Kindesalter zeigten CBD-angereicherte Cannabisextrakte eine positive Wirkung auf die Senkung der Anfallshäufigkeit und eine Verbesserung des Schlafes. Ähnlich wie bei der Behandlung von Multipler Sklerose ist die orale Applikation von CBD auch eine zugelassene Methode für das epileptische Syndrom in den USA (139). Es wird angenommen, dass CBD eine schmerzlindernde, entzündungshemmende und krampflösende Wirkung aufweist. Die Affinität von CBD zu den CB1- und CB2-Rezeptoren ist allerdings geringer als die von der psychoaktiv-wirkenden Substanz THC. Im relativen Vergleich ist das Hervorrufen einer Schmerzlinderung nicht so stark. Obwohl seine Verwendung für die Schmerzbehandlung erst noch klinisch evaluiert werden muss, zeigt sich die analgetische Wirkung, wenn es zusammen mit THC appliziert wird (140). Darüber hinaus zeigt CBD positive Effekte, indem es als anxiolytischer Faktor wirkt. Daher kann die Verwendung von CBD für Patienten mit einer Angststörung ein hilfreicher Ansatz sein (139). Pflanzenextrakte aus Cannabis wie das Arzneimittel Nabiximol kommen häufig bei AIDS-induzierter Kachexie zum Einsatz (141). CBD zeigt auch antioxidative Eigenschaften. Es wird vermutet, dass CBD in Bezug auf seine antioxidativen Kapazitäten ein größeres Potenzial hat verglichen mit Ascorbinsäure und Tocopherol (142). Weiterhin ist bekannt, dass CBD zytostatische und zytotoxische Eigenschaften hat, die dazu beitragen, die Zellmigration und damit die Tumordinvasion zu verhindern und das Überleben der Zellen durch Induktion der Apoptose zu verringern (143).

### 2.2.3 Tobramycin

Der Wirkstoff Tobramycin gehört zur antibiotischen Gruppe der Aminoglycoside, die eine große Bedeutung aufgrund des breiten Anwendungsbereichs haben. Deren Grundstruktur bilden Oligomere aus Kohlenhydrat-verwandten Molekülen, den Diaminocyclitolen, die glycosidisch mit Derivaten von Monosacchariden verknüpft werden. Im therapeutischen Einsatz werden aufgrund der Instabilität die hydrophilen Sulfate verwendet (136). Tobramycin hat eine typische trimere Struktur und wird aus dem Bakterium *Streptomyces tenebrarius* biotechnologisch gewonnen. Der Wirkstoff gelangt in die Bakterienzelle durch passive Diffusion und sauerstoffabhängigen aktiven Transport, weshalb der

Einsatz gegen Anaerobier nur begrenzt möglich ist. Ihre Wirkungsweise beruht auf der irreversiblen Bindung an die 30S-Untereinheit von membranassoziierten Ribosomen und somit auf der Hemmung der bakteriellen Proteinbiosynthese. Dieses verursacht ein fehlerhaftes Ablesen der mRNA. Aus der daraus resultierenden Aminosäuresequenz können keine biologisch funktionsfähigen Membranproteine gebildet werden und es entstehen Poren, durch die das Antibiotikum weiterhin ungehindert in die Zelle eindringen kann und die Bakterizidie hervorruft. Der zweite Wirkungsmechanismus beruht auf einer ionischen Bindung zwischen der polykationischen Struktur des Tobramycin bei physiologischem pH-Wert und den Lipopolysacchariden und Phospholipiden der äußeren Zellmembran Gram-negativer Bakterien bzw. den Teichonsäuren und Phospholipiden der inneren Membran Gram-positiver Bakterien. Die Bindung erhöht die Permeabilität der Membran und damit den Eintritt von Aminoglycosiden (144, 145). Tobramycin wird zur Behandlung von Mukoviszidose-assoziierten bakteriellen Infektionen, aber auch Infektionen der unteren Atemwege, Harnwege, Augen, Knochen und Haut eingesetzt. Nach oraler Applikation wird der Wirkstoff kaum resorbiert und die Elimination erfolgt unverändert renal. Eine gute Bioverfügbarkeit haben parenterale oder lokale Applikationswege, hierbei beträgt die Eliminationshalbwertszeit zwei bis drei Stunden (136, 146). Eine intravenöse Injektion führt zur Verteilung in den meisten Körpergeweben und -flüssigkeiten, wie auch in Bronchialsekreten und Sputum. Der inhalative Applikationsweg variiert in seiner Bioverfügbarkeit aufgrund von Leistungsunterschieden der Vernebler aber auch der Pathologie der Atemwege. Der inhalierte Wirkstoff konzentriert sich hauptsächlich im Atemtrakt, da die Epithelmembran nicht passiert wird. Es reichert sich aber nicht an und wird über das Expektorat eliminiert (147). Tobramycin wird in dieser Arbeit ausschließlich zu Vergleichszwecken in den mikrobiologischen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.2.4 Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro*) verwendet.

#### 2.2.4 Hilfsstoffe

Die nachfolgend vorgestellten Hilfsmittel werden in dieser Arbeit ausschließlich als Vehikel verwendet. Hilfsstoffe sind meist inaktive, inerte Substanzen, die bei der Herstellung von Arzneimitteln eingesetzt werden können und dabei u.a. das Erreichen des Wirkortes oder auch die Freisetzung des Wirkstoffes beeinflussen bzw. regulieren. Im Falle einer Inhalation können sie als Vehikel oder Transportmittel der Wirkstoffe definiert werden. Sie ermöglichen es Wirkstoffe in pharmazeutische Zubereitungen mit definierten physikalisch-chemischen Eigenschaften zu überführen, die an die physiologischen Bedingungen des Wirkortes und die Aufnahme im humanen Organismus angepasst sind. Dabei dürfen sie weder eine eigene therapeutische noch eine toxische Wirkung haben und müssen physiologisch

unbedenklich sein. Darüber hinaus sollten sie eine definierte Stabilität besitzen, die eine standardisierbare Haltbarkeit während des gesamten Lagerungszeitraumes voraussetzt (12). Die hier beschriebenen Substanzen haben zwar eine Unbedenklichkeit als Lebensmittelzusatzstoff und sind befreit von Beschränkungen einer täglichen Einnahme, jedoch sind diese Deklarationen immer als perorale Einnahmen definiert und können auf die inhalativen Applikationen nicht übertragen werden (148). Der Einsatz von Wasser dient zur Viskositätsregelung und beeinflusst somit die physikalischen Eigenschaften der Formulierung. Diese vereinfachte Abbildung eines Vehikels wird zur Grundlagenforschung dieser Arbeit angewandt und ist begründet in der heutigen ubiquitären Verwendung in Liquids für elektronische Zigaretten. Für den medizinischen Einsatz von Wirkstoffen in inhalativen Applikationen sind weiterführende Untersuchungen und klinische Studien notwendig.

#### 2.2.4.1 Glycerin

Das Glycerin, auch Propan-1,2,3-triol und Glycerol, gehört zu der Gruppe der Zuckeralkohole (Alditole) und ist der einfachste dreiwertige Alkohol. In der Europäischen Union ist es als Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoff unter der Bezeichnung E422 zugelassen. Glycerin wird ubiquitär eingesetzt als Lösungsmittel, Weichmacher, Pharmakon und Süßungsmittel. In der Funktion als Wirkstoff übt es als osmotisches Abführmittel eine hygroskopische bzw. lokale Reizwirkung aus. In Augentropfen senkt Glycerin den Augeninnendruck, indem es einen osmotischen Gradienten zwischen Blut und Augenflüssigkeit erzeugt (149). Die orale Einnahme hat eine hohe Bioverfügbarkeit und wird zu 80 – 90% in der Leber über den Glycolyse- oder Gluconeogeneseweg metabolisiert (150). Zuvor muss Glycerin jedoch über drei Teilschritte in Glyceraldehyd-3-phosphat umgewandelt werden. Der erste Schritt ist die Phosphorylierung des Glycerins zum Glycerin-3-phosphat mithilfe des Enzyms Glycerinkinase, darauf folgt die Hydrierung in Dihydroxyacetonphosphat katalysiert durch die Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase. Der letzte Schritt ist die Isomerisierung zu Glyceraldehyd-3-phosphat, einem Zwischenprodukt der Glycolyse (149). Glycerin hat bei oraler Einnahme eine sehr geringe Toxizität (Ratte LD<sub>50</sub> (oral) – 12.600 mg/kg, Mäuse LD<sub>50</sub> (oral) – 15.000 mg/kg, Mensch TDLo (oral) – 1.428 mg/kg) und keinen Maximalwert für eine zulässige Tagesdosis (*acceptable daily intake*, ADI) (151). Die inhalative Anwendung scheint keine Toxizität zu verursachen. In zwei Studien konnten keine behandlungsbedingten Veränderungen in Gewebeproben von Ratten nach 70- bzw. 90-tägigen Exposition nachgewiesen werden (152, 153). Die Gelbe Liste, ein Verzeichnis für alle in Deutschland vertriebenen pharmazeutischen Produkte, beinhaltet 1.963 Produkte, die Glycerin als Inhaltsstoff ausweisen. Eine Anwendung als Aerosol haben davon 66 Produkte dieser Liste, wobei 29 verschreibungspflichtige und 36 apothekenpflichtige Arzneimittel sind. Es befindet sich nur ein nicht apothekenpflichtiges Medizinprodukt in der Liste der glycerinhaltigen Aerosole. Diese 66 Produkte bestehen aus 13 Dosierinhalatoren, 25 Pumpsprays und 28 Nasensprays. Es bestehen

keine öffentlich zugänglichen Informationen über die Konzentration von Glycerin in diesen Produkten (154).

#### 2.2.4.2 Propylenglycol

Propylenglycol, auch Propan-1,2-diol, gehört zu der Gruppe der mehrwertigen Alkanole. In der EU ist es als Lebensmittel- und Futtermittelzusatzstoff unter der Bezeichnung E1520 zugelassen. Propylenglycol wird als Lösungsvermittler und Resorptionsförderer, aber auch als Weichmacher, Feuchthaltemittel und zur Erzeugung von künstlichem Rauch oder Nebel verwendet. Bei letzterer Anwendung kam es vereinzelt zu allergischen Reaktionen bzw. Reizungen von Augen und Rachen (150). Die Europäische Chemikalienagentur urteilte im Dezember 2016, dass diese Effekte nicht ausreichend sind für eine Gefahrenstoffkennzeichnung. Die tödliche orale Dosis wird auf 0,5 – 5 g/kg und die erlaubte Tagesdosis auf 25 mg/kg geschätzt. Propylenglycol hat somit eine sehr geringe Toxizität (Ratte LD<sub>50</sub> (oral) – 20.000 mg/kg) (155). Es wird schnell nach oraler Aufnahme im Magen-Darm-Trakt resorbiert und über die Nieren zu 20 – 45% unverändert innerhalb von 48 Stunden ausgeschieden. Die Metabolisierung von Propylenglycol erfolgt in der Leber mithilfe der Alkoholdehydrogenase zu Lactaldehyd. Aufgrund der anschließenden Oxidation wird mithilfe des Enzyms Aldehyddehydrogenase das Lactat gebildet (156). Ein alternativer Weg der Metabolisierung von Propylenglycol erfolgt über phosphoryliertes Glycol zum Lactat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus (157). Die Inhalation von Propylenglycol scheint keine Toxizität zu verursachen. Eine Studie von Phillips *et al.* konnte keine Veränderungen in Gewebeproben im Rattenmodell nachweisen (152). In einer Studie von Robertson *et al.* konnten nach einer 18-monatigen Exposition gegenüber Affen und Ratten ebenfalls keine Veränderungen in den entnommenen Organen belegt werden (158). Die Gelbe Liste verzeichnet 3.209 pharmazeutische Produkte, die Propylenglycol beinhalten. Eine Anwendung als Aerosol haben 27 Produkte dieser Liste, wobei 8 verschreibungspflichtige und 19 apothekenpflichtige Arzneimittel sind. Es befindet sich ein Betäubungsmittel unter den verschreibungspflichtigen Arzneimitteln, ein Cannabispräparat zur Anwendung als Pumpspray. Diese 27 Produkte bestehen aus 18 Pumpsprays und 9 Nasensprays. Die Pumpsprays sind ausschließlich zum Gebrauch im Mund- und Rachenraum. Die genauen Konzentrationen von Propylenglycol konnten aus Gebrauchsinformationen von 16 Produkten entnommen werden und lagen zwischen 50 und 136 mg/mL, wobei ein Produkt 400 mg/mL Propylenglycol beinhaltete (154).

### 3. Zielstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es einen Beitrag zu leisten über den potentiellen Einsatz der Technologie der elektronischen Zigarette als Inhalationssystem für Applikationen im pharmazeutischen Bereich. Die direkte Inhalation von spezifischen Wirkstoffen mithilfe eines tragbaren flexiblen Applikationssystems stellt eine verfügbare, kostengünstige und qualitätsgeprüfte Gesundheitsmaßnahme zur Kontrolle, Prävention und Heilung von Atemwegserkrankungen dar. Die Modifizierung von einem *electronic nicotine delivery system* (ENDS) zu einem *electronic drug delivery system* (EDDS) folglich zu einem inhalativen Applikationssystem von Arzneimitteln in Form eines Medizinproduktes soll anhand von ausgewählten Parametern geprüft werden.

Für die Untersuchungen wird ein handelsübliches Modell der e-Zigarette der vierten Generation gewählt. Die Wahl der vier Wirkstoffe wird über bereits bekannte inhalative Anwendungen entschieden. Die drei ätherischen Öle Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl weisen eine leichte Flüchtigkeit und eine historische pharmazeutische Anwendung mithilfe von Inhalationen bei Erkältungssymptomen bzw. im zahnmedizinischen Bereich auf. Das eingesetzte Cannabinoid Cannabidiol (CBD) hat einen aktuellen Bezug zu dem pharmazeutischen Markt Deutschlands zur Legalisierung von cannabishaltigen Produkten und der medizinischen Forschung zum inhalativen Konsum. Es werden zunächst relevante wirkstoffhaltige Flüssigformulierungen sogenannte Liquids entwickelt und hinsichtlich ihrer Verdampfbarkeit zu Aerosolen untersucht. Hierbei werden anhand chromatographischer Methoden die quantitative Wiederfindung und mögliche qualitative Veränderungen erfasst und bewertet. Die Interaktion der Aerosole mit den Bestandteilen des Speichels sowie weiterer gastrointestinaler Flüssigkeiten bei oraler Applikation wird über die Anwendung von zugehörigen *in vitro* Modellen und Einsatz von Enzymaktivitäts-Assays geprüft. Da eine Anwendung der Applikation insbesondere bei bakteriell bedingten Infektionskrankheiten der Atemwege denkbar wäre, sollen abschließend mikrobiologische Untersuchungen erfolgen. Es werden ausgewählte Isolate von klinisch relevanten bakteriellen Krankheitserregern mit den jeweiligen Liquids behandelt bzw. bedampft und deren grundlegende Dosis-Wirkungsbeziehung charakterisiert.

Die gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit sollen die Machbarkeit („*proof of concept*“) der Applikationsform als pharmazeutische Technologie prüfen und Voruntersuchungen der medizinischen Anwendbarkeit von inhalativen Applikationen mit wirkstoffhaltigen Liquids darstellen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

Die detaillierte Ausführung der Materialien ist dem Anhang (8.1 Material) zu entnehmen.

#### 4.1.1 Wirkstoffe

Zur Bewertung des Verdampfungsverhaltens einer e-Zigarette wurden vier Wirkstoffe gewählt, die bereits bekannte inhalative Anwendungen aufweisen. Zum einen wurden die drei ätherischen Öle Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl aufgrund ihrer leichten Flüchtigkeit und ihrer historischen pharmazeutischen inhalativen Anwendung gewählt. Es handelt sich um bekannte Phytopharmaka, die bei Erkältungssymptomen bzw. im zahnmedizinischen Bereich eingesetzt werden. Ihre Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol dienen als analytischer Marker zur gaschromatographischen Qualifizierung und Quantifizierung. Zum anderen wurde das Cannabinoid Cannabidiol gewählt, da es einen Bezug zur aktuellen Lage auf dem pharmazeutischen Markt Deutschlands und der medizinischen Forschung aufweist. CBD unterliegt im Gegensatz zu THC nicht dem Betäubungsmittelgesetz und wird als Lebensmittel deklariert. Die deutsche und europäische Rechtslage ist jedoch nicht eindeutig und es befinden sich CBD-haltige Nahrungsergänzungsmittel und Kosmetika auf dem Markt, die in näherer Zukunft auf Verkehrsfähigkeit geprüft werden müssen. Der inhalative Konsum von Cannabis-Pflanzen hat vielfältige belegte pharmakologische Wirkungen, die von cannabinoiden Verbindungen verursacht werden. In den mikrobiologischen Untersuchungen wurde Tobramycin zum Vergleich zwischen einem Antibiotikum und den pflanzlichen Naturstoffen gewählt. Hierbei handelt es sich um ein zugelassenes Arzneimittel mit inhalativer Anwendung.

In folgender Tabelle 1 sind die Modellsubstanzen charakterisiert. Die jeweiligen Analysenzertifikate sind im Anhang (8.1.4 Analysenzertifikate der Wirkstoffe) zu finden.

Tabelle 1: Charakterisierung der untersuchten Modellsubstanzen nach Europäischem Arzneibuch (125) – Die Angaben im Arzneibuch sind verpflichtende pharmazeutische Qualitätsstandards bei der Herstellung von Arzneimitteln in der pharmazeutischen Industrie, i.D. = im Dunkeln

<b>Wirkstoff</b>	<b>Eigenschaften (Pharm. Eur.)</b>	<b>Kennzahlen</b>
<b>Eucalyptusöl (EÖ)</b>	Farblose bis blassgelbe Flüssigkeit, Bestandteile: $\alpha$ -Pinen (0,05 – 10,0%), $\beta$ -Pinen (0,05 – 1,5%), Sabinen ( $\leq$ 0,3%), $\alpha$ -Phellandren (0,05 – 1,5%), Limonen (0,05 – 15,0%), <b>1,8-Cineol</b> ( $\geq$ 70,0%), Campfer ( $\leq$ 0,1%)	CAS Nr.: 84625-32-1 $\rho = 912 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Minzöl (MÖ)</b>	Farblose, schwach gelbe oder grünlich gelbe Flüssigkeit, Bestandteile: Limonen (1,5 – 7,0%), 1,8-Cineol ( $\leq$ 1,5%), Menthon (17,0 – 35,0%), Isomenthon (5,0 – 13,0%), Menthylacetat (1,5 – 7,0%), Isopulegol (1,0 – 3,0%), <b>Menthol</b> (30,0 – 50,5%), Pulegon ( $\leq$ 2,5%), Carvon ( $\leq$ 2,0%)	CAS Nr.: 90063-97-1 $\rho = 895 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Nelkenöl (NÖ)</b>	Klare, gelbe Flüssigkeit, die sich an der Luft braun färbt, Bestandteile: $\beta$ -Caryophyllen (5,0 – 14,0%), <b>Eugenol</b> (75,0 – 88,0%), Acetyleugenol (4,0 – 15,0%)	CAS Nr.: 84961-50-2 $\rho = 1055 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Cannabidiol (CBD)</b>	Weißes kristallines Pulver	CAS Nr.: 13956-29-1 M = 314,46 g/mol Lagerung: 4°C i.D.

#### 4.1.2 Vehikel

Die zu verdampfenden Liquids bestehen jeweils aus einem Wirkstoff und einem Vehikel. Ein Vehikel ist ein Hilfsstoff, welcher als Träger der arzneilich wirkenden Substanz fungiert. Die Aufgabe des Hilfsstoffes ist u.a. das Freisetzen des Wirkstoffes in einer reproduzierbaren Menge an einem spezifischen Wirkort. Da bereits vielfältige Anwendungen der e-Zigarette kommerziell erhältlich sind, wurde eine handelsübliche Grundformulierung gewählt. Der Vorteil dieser Wahl ist eine grundsätzlich gegebene Verdampfbarkeit, die nicht mehr geprüft werden musste. Diese kommerziellen Formulierungen bestehen zum größten Teil aus drei Grundstoffen zu unterschiedlichen prozentualen Teilen: Propylenglycol, Glycerin und Wasser. Dieses sogenannte Basisliquid bildet die wirkstofffreie Grundlage, die in den folgenden Untersuchungen ausschließlich als Transportmittel verwendet und somit nicht quantitativ erfasst oder unter anderen Aspekten untersucht wurde.

Zur Herstellung des Basisliquids wurden die in Tabelle 2 dargestellten Hilfsstoffe zusammengeführt und in einem Becherglas mit einem Magnetrührer für 5 Minuten bei 500 rpm homogenisiert.

Tabelle 2: Charakterisierung des Basisliquids als Vehikel für die Modellsubstanzen (125) – dargestellt sind die prozentualen Anteile, die Eigenschaften und Kennzahlen der drei Bestandteile des Basisliquids Propylenglycol, Glycerin und Wasser, i.D. = im Dunkeln

Hilfsstoff	Prozentuale Anteile	Eigenschaften	Kennzahlen
<b>Propylenglycol (PG)</b>	50%	Klare, farblose, viskose, hygroskopische Flüssigkeit	CAS Nr.: 57-55-6 M = 76,09 g/mol $\rho = 1036 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Glycerin</b>	40%	Farblose bis fast farblose, klare, sich fettig anfühlende, sirupartige, sehr hygroskopische Flüssigkeit	CAS Nr.: 56-81-5 M = 92,09 g/mol $\rho = 1263 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Wasser</b>	10%	Rein (HPLC grade)	CAS Nr.: 7732-18-5 M = 18,02 g/mol $\rho = 997 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.

#### 4.1.3 Liquids

Die zur Untersuchung hergestellten Liquids bestehen aus einem Wirkstoff und dem Basisliquid. Nach Europäischem Arzneibuch kann die Löslichkeit der ätherischen Öle als schwer löslich und die Löslichkeit des Cannabidiols als sehr schwer löslich im Basisliquid deklariert werden (125). Dieses wurde in Voruntersuchungen am Basisliquid geprüft. Die Wirkstoffkonzentrationen in den Formulierungen wurden in Abhängigkeit derer homogenen Löslichkeit im Basisliquid gewählt. Zur Herstellung wurden die in Tabelle 3 dargestellten Bestandteile der Formulierungen zusammengeführt und homogenisiert. Die Herstellung der Liquids ist dem Anhang (8.2.1 Wirkstoffhaltige Liquids) zu entnehmen.

Tabelle 3: Zusammensetzung der Liquids – prozentuale Angaben der Wirkstoffe in Liquids in Massenprozent

Liquid	Zusammensetzung
<b>Eucalyptusöl-Liquid (EL)</b>	1% (w/w) Eucalyptusöl in Basisliquid
<b>Minzöl-Liquid (ML)</b>	1% (w/w) Minzöl in Basisliquid
<b>Nelkenöl-Liquid (NL)</b>	1% (w/w) Nelkenöl in Basisliquid
<b>Cannabidiol-Liquid (CL)</b>	0,5% (w/w) Cannabidiol in Basisliquid
<b>Tobramycin-Liquid (TL)</b>	1% (w/w) Tobramycin in Basisliquid

#### 4.1.4 Extrakte und Liquids aus unbehandeltem und decarboxyliertem Pflanzenmaterial

Neben dem reinen 0,5%-haltigen Cannabidiol-Liquid wurden ebenfalls zwei Rohstoffe für die Verarbeitung zum Liquid eingesetzt. Zum einen wurde eine frei verkäufliche Cannabisblütensorte (Blue Dream) mit hohem CBD-Gehalt direkt in Propylenglycol extrahiert. Analog wurde die Herstellung an einem Eigenanbau der Nutzhanfsorte Antal der Firma Hofmann & Sommer durchgeführt. Wie bereits in Kapitel 2.2.2 Cannabidiol beschrieben, liegt das Cannabidiol in Pflanzen als Cannabidiolsäure vor und muss erst durch Wärmebehandlung in die pharmakologisch wirksame Form umgewandelt werden. Die beiden Cannabissorten wurden als unbehandeltes und decarboxyliertes Pflanzenmaterial zu Liquids verarbeitet. Das Verfahren zur Decarboxylierung wurde bei 100°C für drei Stunden in einem ThermoMixer (Eppendorf) in Reaktionsgefäßen (1,5 mL) durchgeführt. Für die Extraktion wurde das Standardprotokoll aus der Monographie „Cannabisblüten“ des Deutschen Arzneibuchs verwendet (159). In Abbildung 16 sind die beiden Cannabisblüten der Sorten „Antal“ und „Blue Dream“ dargestellt.



**Abbildung 16:** Cannabisblütensorten für den Einsatz zur Herstellung von Liquids – a. Sorte „Antal“ als Eigenanbau der Firma Hofmann & Sommer, b. Sorte „Blue Dream“ der Firma Easy Hemp

Die Herstellung der Liquids wurde optimiert und zu einem Protokoll zusammengefasst. In der Tabelle 4 sind die Vorgehensweisen dargestellt.

Tabelle 4: Herstellung der Extrakte (159) und Liquids aus den zwei Cannabisblütensorten „Blue Dream“ und „Antal“  
– BD = Blue Dream, CBD = Cannabidiol, RT = Raumtemperatur

<b>Extrakte/ Liquids</b>	<b>Herstellung</b>
<b>Cannabis-Extrakt „Blue Dream“ und „Antal“ für Gehaltsbestimmung CBD:</b>	0,5 g pulverisierte, homogenisierte Droge werden 15 min lang mit 20 mL Ethanol (96%) geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Der klare Überstand wird überführt. Der Rückstand wird zweimal mit Ethanol (96%) gleichermaßen behandelt. Die Fraktionen werden vereinigt, zu 50 mL ergänzt und durch einen Membranfilter ( $\varnothing = 0,45 \mu\text{m}$ ) filtriert.
<b>Cannabis-Mazerat „Blue Dream“ (BD) für Herstellung BD-Liquid:</b>	1,0 g pulverisierte, homogenisierte Droge werden 24 h lang bei RT im Dunkeln mit 5,0 g Propylenglycol mazeriert und anschließend im Vakuum filtriert.
<b>BD-Liquid (BD-L):</b>	3,5 g Cannabis-Extrakt BD, 2,8 g Glycerin und 0,7 g H <sub>2</sub> O werden unter Rühren vollständig gelöst. Lagerung bei 4°C
<b>Cannabis-Mazerat „Antal“ für Herstellung Antal-Liquid:</b>	10,0 g pulverisierte, homogenisierte Droge werden 24 h lang bei RT im Dunkeln mit 35,0 g Propylenglycol mazeriert und anschließend im Vakuum filtriert.
<b>Antal-Liquid (Antal-L):</b>	20,0 g Cannabis-Extrakt Antal, 16 g Glycerin und 4 g H <sub>2</sub> O werden unter Rühren vollständig gelöst. Lagerung bei 4°C

Nach jedem Herstellungsschritt wurde eine Gehaltsbestimmung durchgeführt. Zusätzlich zum Verdampfungsprotokoll wurden die Leistung der e-Zigarette und die Anzahl der Züge vor der Probenahme anhand des Cannabidiol-Liquids (CL) variiert und ausgewertet.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Grundlagen

Nachfolgend werden zuvor die grundsätzlichen konstanten Parameter vorgestellt. Die Auswahl über Modelle und Untersuchungsarten stellt die Grundlage bei der Bewertung der Umsetzung dieser Zielstellung dar. Der Versuch einen Beitrag über den potentiellen, medizinischen Einsatz der e-Zigarette zu leisten, war das Anliegen dieser Arbeit.

#### 4.2.1.1 Technologie der elektronischen Zigarette (e-Zigarette)

Die für die Untersuchungen ausgewählte elektronische Zigarette ist ein handelsübliches Modell der vierten Generation. Es wurde das Gerät „Cuboid Mini“ der Firma Shenzhen Joyetech Co.,Ltd. gewählt (Abbildung 17a). Über einen vorhandenen OLED-Bildschirm (*organic light-emitting diode*) werden die vorgenommenen Einstellungen Leistung, Widerstand der Heizspule und der aktuelle Stromfluss während eines Zuges angezeigt. Die e-Zigarette verfügt über den sogenannten VW-Modus (*variable wattage*), welcher die Regulierung der Ausgangsleistung des Gerätes zwischen 1 und 80 Watt erlaubt. Die Feuertaste wird über die gesamte Dauer eines Zuges gedrückt gehalten, somit wird ein Leistungsfluss vom Akku zum Verdampfer bewirkt. Sie verfügt über einen geregelten Überhitzungsschutz von maximal 10 Sekunden für jeden einzelnen Zug. Ein längeres Drücken der Feuertaste bewirkt das Abschalten des Gerätes. In den Untersuchungen wurden jeweils nur vollständig geladene Akkus zur Aerosolerzeugung verwendet. Bei einer Abnahme des Ladezustandes auf unter ein Viertel wurden die Geräte ausgetauscht bzw. über den Micro USB Port geladen.

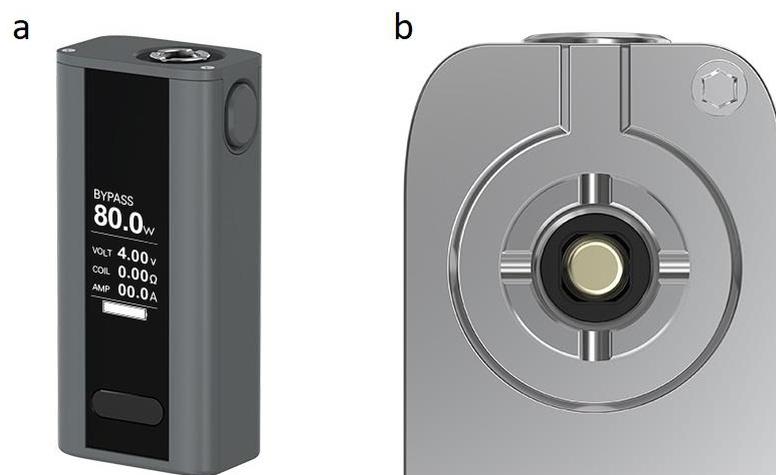
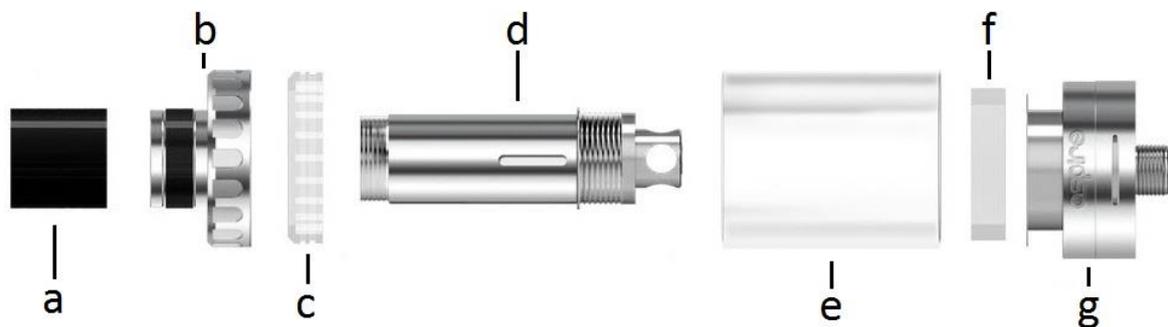


Abbildung 17: Elektronische Zigarette „Cuboid Mini“ der Firma Shenzhen Joyetech Co., Ltd. adaptiert von (160) – a. dargestellte e-Zigarette mit den Maßen 3,5 x 2,2 x 7,7 cm (b x t x h); b. 510er Gewindeanschluss der e-Zigarette zum Clearomizer

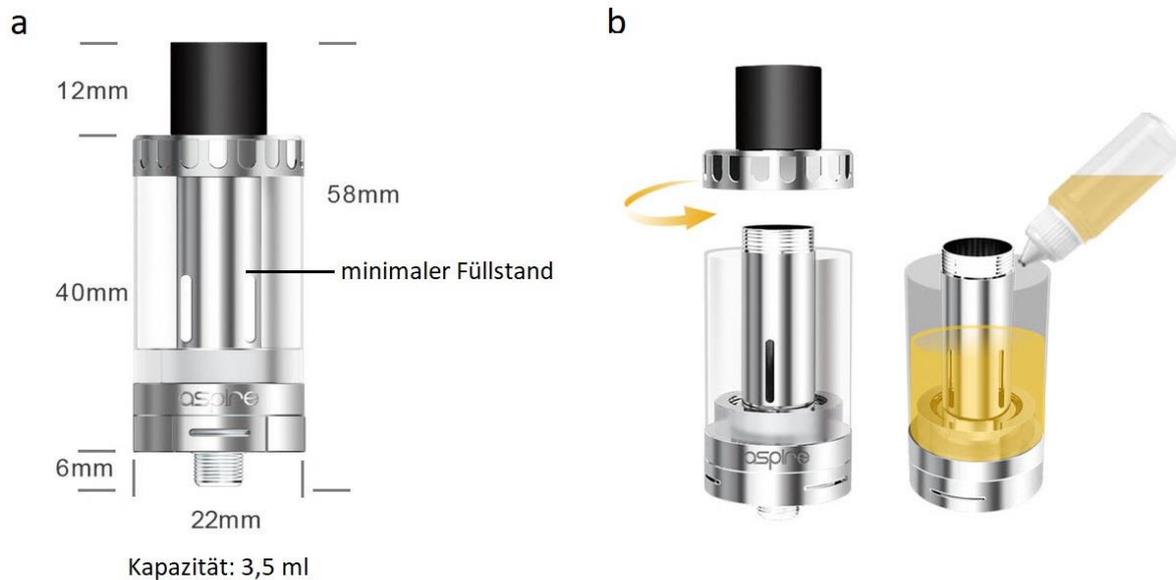
Die e-Zigarette wurde mit wiederbefüllbaren „Aspire Cleito“ Clearomizern der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd. betrieben, welche über einen universellen 510er Gewindeanschluss mit der e-Zigarette verschraubt werden können (Abbildung 17b). Das Material des Clearomizers ist aus Edelstahl und der transparente Tank mit einem Volumen von 3,5 mL besteht aus Pyrexglas, ein hitzebeständiges Borosilikatglas. Das in der Abbildung 18 dargestellte Mundstück (a) wurde in der Probenahme nicht verwendet, da der Schlauch direkt mit dem oberen verschraubbaren Deckel (b) luftdicht verbunden werden konnte.



**Abbildung 18: Bauteile des Clearomizers „Aspire Cleito“ der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd. adaptiert von (77)** – a. Mundstück, b. obere verschraubbare Hardware, c. oberer Dichtungsring, d. Verdampferkopf, e. transparenter Tank aus Pyrexglas, f. unterer Dichtungsring, g. untere Hardware mit 510er Gewinde und Luftstromregulierung

Die Anwendung eines Clearomizers beschränkt sich auf die Untersuchung eines bestimmten Liquids, dadurch werden eventuelle Wechselwirkungen oder Verunreinigungen zwischen den Bestandteilen der Liquids vermieden. Die Verdampferköpfe wurden regelmäßig auf Abnutzung untersucht jedoch spätestens nach 50 Probenahmen ausgetauscht, da es sich hierbei um Verschleißteile handelt. Die Verdampfer sind für die Leistungsbereiche 20 – 60 und 55 – 70 Watt erhältlich und werden spezifisch angepasst an die durchzuführende Untersuchung. Die Tanks wurden über das Top-Filling-System (Abbildung 19b) mit dem jeweiligen Liquid befüllt. Eine Standzeit von 15 Minuten sollte ein vollständiges gleichmäßiges Aufsaugen des Liquids im Inneren des Verdampferkopfes gewährleisten. Der minimale Füllstand des Liquids während der Probenahme wurde bis zur Markierung definiert, die in Abbildung 19a dargestellt ist. Die Markierung befindet sich oberhalb des Sichtfensters der Watte, so konnte eine vollständige Benetzung der Watte mit Liquid gewährleistet werden.

Nach jeder Untersuchung wurde der Tank vollständig entleert, mit Ethanol gereinigt und anschließend getrocknet.

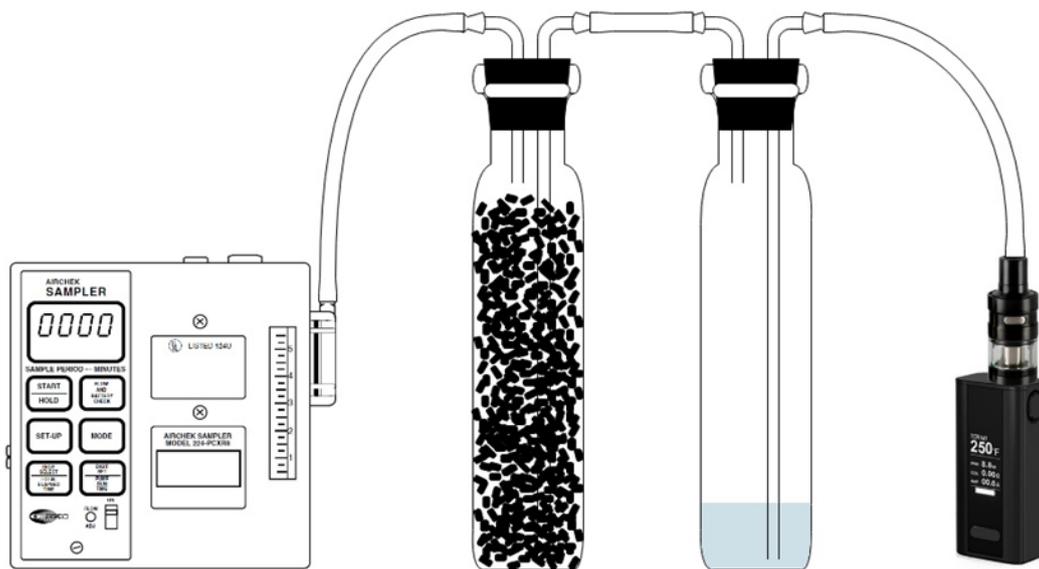


**Abbildung 19:** Clearomizer "Aspire Cleito" der Firma Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd. modifiziert nach (77) – a. Clearomizer mit den Maßen aller Bauteile und dem definierten minimalen Füllstand für die Verdampfungen der Liquids, b. Top-Filling-System des Clearomizers

#### 4.2.1.2 Konstruktion der Aerosol-Probenahme

Für die Probenahme der Aerosole wurde eine mobile Apparatur entwickelt, die Zubehör für Austausch und Erweiterungen des Systems ermöglicht. Zahlreiche Optimierungsschritte führten letztendlich zu einer finalen Lösung, die auf Dichtigkeit und Reproduzierbarkeit geprüft wurde. Die Anforderung an die Probenahme war eine möglichst reale und standardisierte Inhalation zu simulieren. Hierfür wurde ein Verdampfungsprotokoll erarbeitet, welches grundsätzlich auf der ISO-Norm ISO/TR 19478-2:2015 (ISO und Health Canada Intense Abrauchparameter - Teil 2: Untersuchung von Faktoren, die bei Routinemessungen zur Variabilität der Werte für TPM, Wasser und NFDPM in Zigarettenrauch bei Routinemessungen beitragen) beruht, jedoch an die Konstruktion und die jeweiligen Untersuchungen modifiziert wurde (161).

Die Konstruktion der Aerosol-Probenahme ist in der Abbildung 20 dargestellt. Die e-Zigarette wurde über einen Schlauch mit der Glas-Olive einer Waschflasche verbunden. Die Waschflasche hatte ein Fassungsvermögen von 100 mL und war über einen 29/32 Normschliff mit dem Aufsatz verbunden. Der Waschflaschen-Aufsatz bildete die Verbindung zwischen e-Zigarette und Lösungsmittel, sodass das erzeugte Aerosol direkt eingeleitet werden konnte. Eine zweite Waschflasche, gefüllt mit granulierter Aktivkohle direkt in Reihe verbunden, diente als Feuchtefalle zum Schutz der anschließenden Pumpe vor Restfeuchte. Die Aktivkohle weist eine sehr große, reversible Adsorptionsfähigkeit auf und wurde in regelmäßigen Abständen thermisch regeneriert bzw. ausgetauscht.



**Abbildung 20: Konstruktion zum standardisierten Verdampfen von Liquids mithilfe der e-Zigarette und Probenahme von Aerosolen** – Die Universal-Probenahmepumpe PCMTX8 der Firma SKC Ltd. (links) ist verbunden mit der Waschflasche zur Adsorption der feuchten Dämpfe. Das Adsorbens ist Aktivkohle. Diese Feuchtefalle ist verbunden mit der Waschflasche zur Probenahme. Ein definiertes Volumen an entsprechendem Lösungsmittel wird in die Probenahme-Waschflasche gefüllt. Das Aerosol wird über ein definiertes Zugvolumen und eine definierte Zuggeschwindigkeit in der e-Zigarette (rechts) erzeugt. Die vier Elemente der Konstruktion sind miteinander über PVC-Schläuche verbunden. PVC = Polyvinylchlorid

Die Probenahmepumpe war eine Konstantfluss-Luftprobenpumpe, die die erforderlichen Bedingungen erfüllt. Es ist davon auszugehen, dass ein bestimmter Anteil des Aerosols in der Feuchtefalle verloren gegangen ist. Diese Tatsache wird dem Ausatmen bei physiologischer Inhalation gleichgestellt und aus diesem Grund wurde die Pumpe während der Probennahme kontinuierlich in Betrieb gehalten. Als Verbindungsstücke zwischen den einzelnen Modulen dienten transparente Weich-PVC Lebensmittelschläuche (Rehau AG), welche chemikalienresistent und beständig gegenüber Säuren und Laugen sind. In regelmäßigen Abständen wurden diese ersetzt und auf Dichtigkeit überprüft. Um in

der Konstruktion Totvolumina gering zu halten bzw. zu vermeiden, wurde die Länge der Schläuche konstant und so kurz wie möglich gehalten. Die konstante Flussrate ermöglichte eine gleichmäßige Aerosolgewinnung und zudem die Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit der ermittelten Ergebnisse unter den eingestellten Bedingungen. Zur ständigen Überprüfung und Bestätigung der Flussrate wurde der Massenflussmesser GFM 17 (Analyt-MTC GmbH) vor jeder Messung an Stelle der e-Zigarette mit der Apparatur verbunden. Das für diese Arbeit standardisierte Verdampfungsprotokoll ist in folgender Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Standardisiertes Verdampfungsprotokoll mit definierten Parametern und Variablen

<b>Leistung der e-Zigarette</b>	20 – 80 Watt
<b>Zugdauer</b>	4 Sekunden
<b>Flussrate Pumpe</b>	0,75 L/min
<b>Intervall</b>	30 Sekunden
<b>Zyklus</b>	10 Züge
<b>Volumen Lösungsmittel in Waschflasche</b>	1 – 15 mL
<b>Volumen Aerosol pro Zug</b>	50 mL

Anlehnend an die ISO-Norm ISO/TR 19478-2:2015 wurde ein Zugvolumen von 50 mL Aerosol gewählt (161). Die gewählte Methode sollte dieses Verhalten auf die vorliegenden Untersuchungen übertragen und eine Standardisierung schaffen. Nach jedem Zug folgte eine Inhalationspause von 30 Sekunden. Eine Flussrate von 0,75 L/min führte bei einer Zugdauer von 4 Sekunden zum beabsichtigten Volumen von 50 mL. Die Probenahme der zu untersuchenden Inhalationsprobe wurde nach einem Zyklus bzw. 10 Zügen festgelegt. Je nach Schwerpunkt konnten die Parameter verändert oder optimiert werden. Derartige Modifizierungen werden gesondert in den Durchführungen der jeweiligen Methoden aufgeführt.

## 4.2.2 Quantitative und qualitative Untersuchungen der Liquids bzw. Aerosole

### Prinzip

Die Chromatographie (griech. *chroma* – „Farbe“, *graphein* – „schreiben“) ist ein analytisches bzw. präparatives Verfahren zur physikalisch-chemischen Auftrennung von Stoffgemischen nach spezifischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten. Das grundsätzliche Prinzip gleicht sich in allen technischen Ausführungen und ist bauartbedingt immer ein Batch-Prozess. Der Analyt fließt zusammen mit einer mobilen Phase über eine stationäre Phase, die aufgrund spezifischer Eigenschaften mit dem Analyten wechselwirkt. Diese Wechselwirkung zusammen mit den technischen Parametern führen zur Elution bzw. Detektion des Analyten nach einer spezifischen Zeitdauer (Abbildung 21). Das grundsätzliche Kriterium ist somit das Vorhandensein zweier nicht miteinander mischbaren Phasen. Der Prozess ist gegliedert in Injektion, Auftrennung und Detektion. Jeder dieser Teilprozesse wird individuell in technischen Modulen umgesetzt und hat eine große Variation an Eigenschaften (162).

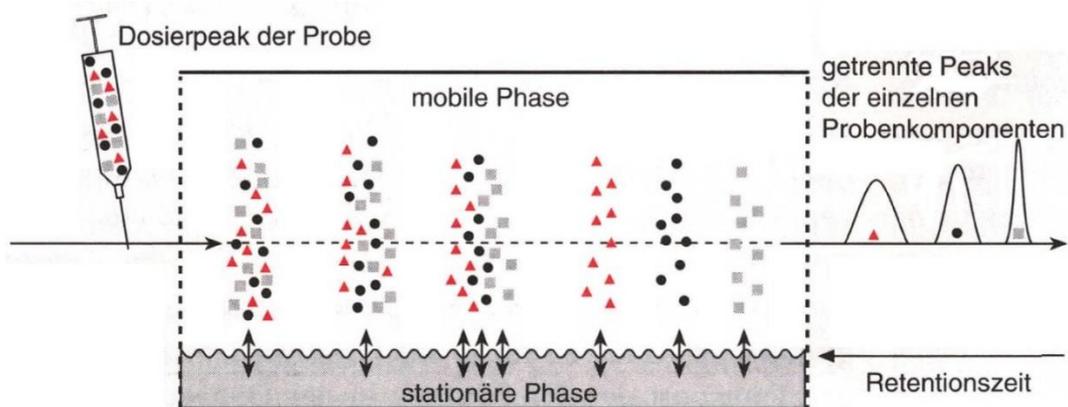


Abbildung 21: Chromatographische Trennung eines Stoffgemisches aufgrund von unterschiedlicher Retention während des Transportes durch die stationäre Phase adaptiert von (162) – dargestellt sind die abnehmend starken Wechselwirkungen (■ < ● < ▲) der Probe mit dem chromatographischen Bett

Da in der vorliegenden Arbeit flüssigkeits- (LC) und gaschromatographische (GC) Methoden angewandt wurden, beziehen sich die folgenden Beispiele auf diese zwei wichtigsten chromatographischen Trennverfahren. Die Injektion erfolgt manuell oder über einen Autosampler, ein automatisiertes Aufgabesystem. Die injizierte Probe fließt mit der mobilen Phase, die flüssig (Eluent) oder gasförmig (Trägergase: He, H<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>) sein kann, zur stationären Phase. Der Fluss wird mithilfe von Druck, über eine Pumpe (LC) oder den Gasdruck (GC), erreicht. Die stationäre Phase ist eine Trennsäule, die passend zur Beschaffenheit der Probe gewählt wird. Sie beinhaltet eine trennwirksame Schicht, die über Modifikationen ein breites Eigenschafts- und somit Anwendungsspektrum abdecken kann. Das Trennprinzip kann beispielsweise aufgrund von Adsorptionen, Löslichkeiten, Ionenaustausch, Größe, Affinitäten, Chiralitäten u.a. durchgeführt werden. Die Verweildauer des Analyten in der stationären Phase wird als Retentionszeit bezeichnet, die für jede detektierte Substanz geräte- und säulenabhängig spezifisch ist. Während des Trennvorgangs kommt es zu reversiblen Verteilungsgleichgewichten zwischen dem Analyten und den beiden Phasen, die je nach Stärke der Wechselwirkungen zeitlich unterschiedlich retendiert werden. Je größer die Differenz dieser Wechselwirkungen, desto genauer die Auflösung zweier Komponenten im zu trennenden Substanzgemisch. Die Arten der Detektion sind ebenfalls sehr vielseitig: Lichtabsorption, Wärmeleitfähigkeit, Lichtstreuung, Fluoreszenz und weitere. Die graphische Darstellung der quantitativen oder qualitativen Ergebnisse wird als Chromatogramm bezeichnet. Das Detektorsignal wird in einer Auswerteeinheit gegen die Zeit aufgetragen und ergibt die Darstellung der sogenannten Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC). Die Quantifizierung erfolgt aufgrund einer externen Kalibrierung mit Standardsubstanzen (162, 163).

Die hier verwendete gaschromatographische Methode beruht auf dem Prinzip der Adsorption zur Auftrennung von Stoffgemischen, die in einem für GC-Systeme möglichen Temperaturbereich einen ausreichenden Dampfdruck aufweisen. Die mobile Phase ist ein inertes Trägergas (H<sub>2</sub>), welches die Probe vom Injektor durch eine gepackte Kapillarsäule, die stationäre Phase, bis zum Detektor führt. Im Innern der Säule befindet sich ein unpolares Polysiloxangerüst mit 65% Dimethylresten, die mit dem Analyten über Van-der-Waals-Kräfte wechselwirken. An den polaren Phenylresten, die zu 35% vorkommen, kann es zu einer Polarisierung der aromatischen Elektronenpaare kommen und der Trennvorgang wird dadurch beeinflusst.

Der verwendete Flammenionisationsdetektor (FID) ionisiert den Analyten an einer Düse in einer Wasserstoff/Luft-Flamme und es entstehen positive Ionen, die von einem Kollektor eingefangen werden. Dieser von der Düse zum Kollektor fließende Strom bildet das Signal, welches vom Datensystem verarbeitet wird. Der schematische Aufbau einer GC-Anlage ist in Abbildung 22 dargestellt.

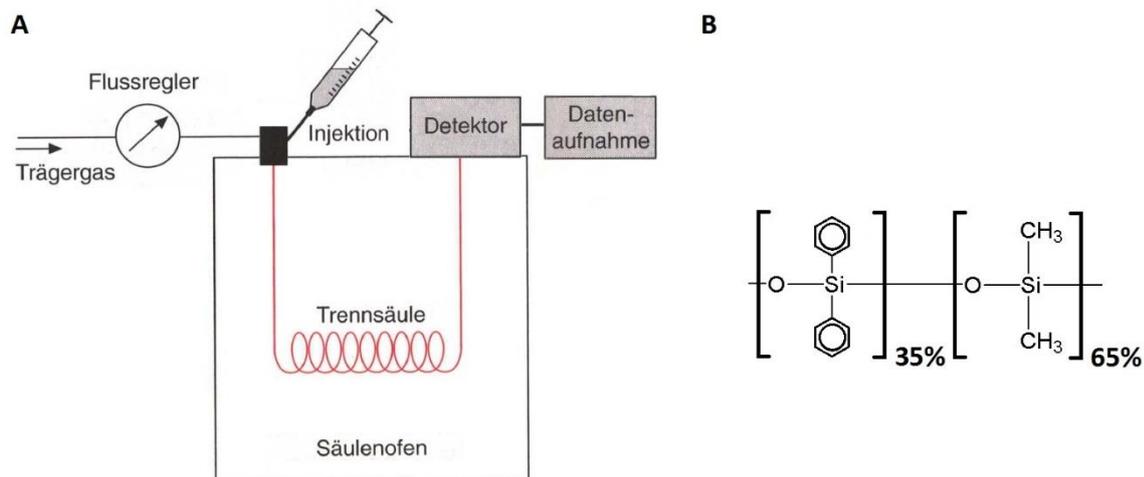


Abbildung 22: Schematischer Aufbau eines gaschromatographischen Systems modifiziert nach (162) – A = Hauptkomponenten einer GC-Anlage, B = stationäre Phase der Kapillarsäule RTX 35 mit Poly(35%-phenyl-65%-methylsiloxan)

Die chromatographischen Analysen von Cannabidiol beruhen auf dem Prinzip der Adsorptionschromatographie genauer der Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie (*Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC). Dabei besteht die stationäre Phase aus einer hydrophoben, unpolaren Modifikation von Siliciumdioxid (Kieselgel). Polare Substanzen werden im Vergleich zu unpolaren Substanzen aufgrund der schwachen Wechselwirkungen schneller eluiert. Die Trennung der Komponenten erfolgt somit aufsteigend nach ihrer Hydrophobizität. Ein isokratischer Trennvorgang besteht aus einem Eluenten, der konstant bleibt im zeitlichen Verlauf der Methode.

Eine Gradientenelution hingegen ermöglicht aufgrund ihrer definierten Variation der wässrigen und organischen Anteile in der mobilen Phase im zeitlichen Verlauf der Methode eine effiziente Auftrennung durch Änderung der Elutionskraft. Die Parameter der Polarität können somit erweitert und modifiziert werden (162). Der schematische Aufbau der verwendeten HPLC-Anlage ist in der Abbildung 23 dargestellt.

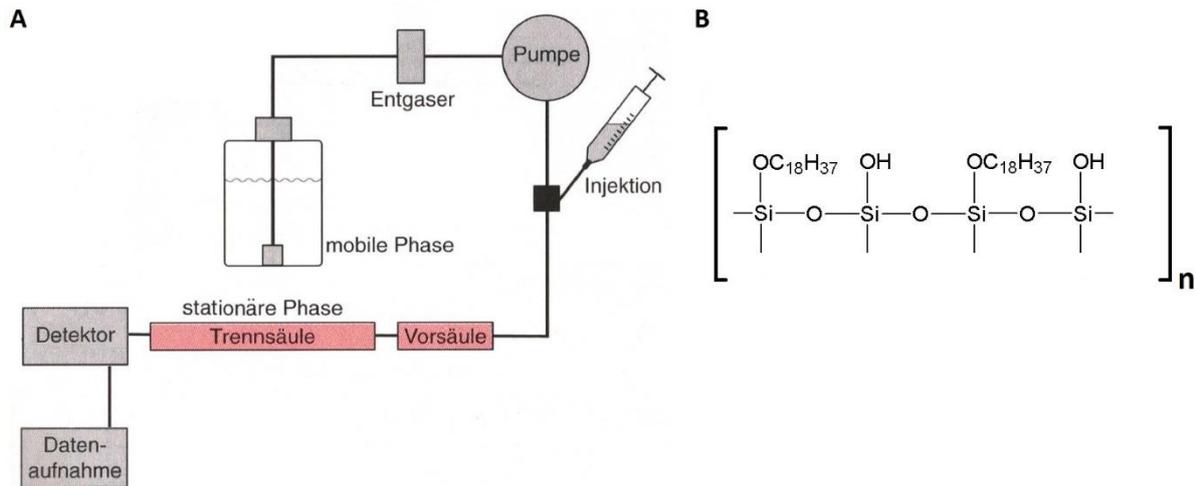


Abbildung 23: Schematischer Aufbau eines flüssigchromatographischen Systems modifiziert nach (162) – A = Hauptkomponenten einer HPLC-Anlage, B = stationäre Phase der ZORBAX SB-C<sub>18</sub> mit Octadecyl-Reste (RP<sub>18</sub>)

Die mobile Phase wird entgast über Pumpen gefördert und gelangt zusammen mit der aufgegebenen Probe in die stationäre Phase. In der RP-Chromatographie besteht diese aus dem Grundgerüst des Kieselgels modifiziert durch Octadecyl-Reste (RP<sub>18</sub>), die die Polarität umkehren. Im Anschluss des Trennprozesses werden die Komponenten der Probe detektiert. Der UV/Vis-Detektor ist ein Standarddetektor, der auf der Messung von Lichtabsorption in diesem Spektralbereich beruht. Die Lichtabsorption eines Analyten ist nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zu derer Konzentration und der Schichtdicke der Küvette. Der Detektor mit variabler Wellenlängen ermöglicht die Einstellung im ultravioletten (Deuteriumlampe, 190 – 370 nm) oder sichtbaren (Wolfram-Halogenlampe, 370 – 800 nm) Bereich des Spektrums.

#### Durchführung

Zur qualitativen und quantitativen Analytik der Untersuchungssubstanzen wurde das Verfahren der Kalibrierung mit externen Standards angewandt. Die graphische Darstellung der detektierten Peakflächen zur jeweiligen Konzentration ermöglicht die Geradengleichung der linearen Regression. Die Anpassungsgüte der linearen Regression an die Streuung der Ergebnisse erfolgt über den linearen Zusammenhang des Bestimmtheitsmaßes R<sup>2</sup>. Die eingesetzten Methoden durchliefen einen

Validierungsprozess, welcher im Anhang (8.3 Validierung der chromatographischen Methoden) zu finden ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine gaschromatographische Methode entwickelt und validiert werden, die die Leitsubstanzen 1,8-Cineol (Eucalyptusöl), Menthol (Minzöl) und Eugenol (Nelkenöl) in 2-Propanol parallel erfasst. Hierfür wurden externe Kalibrierungen mit den Standardsubstanzen der jeweiligen Leitsubstanzen durchgeführt, wie in Tabelle 6 dargestellt.

**Tabelle 6: Kalibrierungen der externen Standards für die Analyse der Leitsubstanzen** – dargestellt sind die externen Standardsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol zur Untersuchung der jeweiligen Leitsubstanzen der ätherischen Öle, ihre Reinheit und die Kalibrierungsbereiche

<b>Externer Standard</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Kalibrierung</b>
<b>1,8-Cineol</b>	99,5%	0,046 – 4,587 mg/mL 1,8-Cineol
<b>Menthol</b>	100,0%	0,05 – 2,4 mg/mL Menthol
<b>Eugenol</b>	99,1%	0,011 – 2,535 mg/mL Eugenol

Die grundlegenden Einstellungen zur Modifizierung der gaschromatographischen Methode wurden aus den Monographien der ätherischen Öle des Europäischen Arzneibuchs entnommen. Die folgende Tabelle 7 stellt die validierte gaschromatographische Methode dar.

**Tabelle 7: Gaschromatographische Methode für die quantitative Analytik der Leitsubstanzen der ätherischen Öle mithilfe des Hewlett Packard 5890 Series II GC-Systems modifiziert nach (125)**

<b>Säule</b>	Restex Rtx 35, l=30m x 0,25mm, d = 0,25µm
<b>Vorsäule</b>	Restex Rtx 35, l= 5m x 0,25mm, d = 0,25µm
<b>Detektor</b>	Flammenionisation (FID)
<b>Trägergas</b>	H <sub>2</sub>
<b>Split</b>	1:30 (60 mL/min)
<b>Injektionsvolumen</b>	1,0 µL
<b>Temperatur Probeneinlass</b>	280°C
<b>Temperatur Detektor</b>	300°C
<b>Temperaturprogramm</b>	3 min 50°C, 25 min 226 °C (8°C/min), 26,4 min 260°C (25°C/min), 36,4 min 260°C STOP

Zunächst wurden die ätherischen Öle in drei verschiedenen Konzentrationen in Basisliquid hergestellt, um eine mögliche Linearität im Aerosol zu erfassen. Die bereits dargestellten Liquids EL, ML und NL (siehe Unterkapitel 4.1.3 Liquids) wurden demnach jeweils um zwei Konzentrationen erweitert. Anhand der externen Kalibrierung wurden die jeweiligen Leitsubstanzen quantifiziert. Somit ergeben sich folgende Liquids der Modellsubstanzen (Tabelle 8) zur quantitativen Analyse ihrer Aerosole.

**Tabelle 8:** Herstellung der Liquids mit ätherischen Ölen zur gaschromatographischer Untersuchung (GC) - Basisliquid = Propylenglycol:Glycerin:H<sub>2</sub>O (5:4:1), Prozentangaben in Massenprozent (w/w)

<b>Liquid</b>	<b>Abkürzung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Eucalyptusöl-Liquid</b>	EL0,5	0,5% Eucalyptusöl in Basisliquid
	EL	1,0% Eucalyptusöl in Basisliquid
	EL1,5	1,5% Eucalyptusöl in Basisliquid
<b>Minzöl-Liquid</b>	ML0,5	0,5% Minzöl in Basisliquid
	ML	1,0% Minzöl in Basisliquid
	ML1,5	1,5% Minzöl in Basisliquid
<b>Nelkenöl-Liquid</b>	NL0,5	0,5% Nelkenöl in Basisliquid
	NL	1,0% Nelkenöl in Basisliquid
	NL1,5	1,5% Nelkenöl in Basisliquid

Vergleichende Untersuchungen unter den gegebenen Bedingungen aus dem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) wurden durchgeführt und ausgewertet. Zusätzlich wurde die Leistung der e-Zigarette anhand des Eucalyptusöl-Liquids variiert und ausgewertet.

Die chromatographischen Analysen von Cannabidiol beruhen auf dem Prinzip der RP-HPLC. Die externe Kalibrierung zur Quantifizierung des Cannabidiols im reinen 0,5%-haltigen Cannabidiol-Liquid und den zwei Extrakt-Liquids erfolgt anhand der Standardsubstanz Cannabidiol wie in Tabelle 9 dargestellt.

**Tabelle 9:** Kalibrierung des externen Standards für die Analyse von Cannabidiol – dargestellt ist die externe Standardsubstanz Cannabidiol zur Untersuchung der CBD-haltigen Liquids, die Reinheit und der Kalibrierungsbereich

<b>Externer Standard</b>	<b>Reinheit</b>	<b>Kalibrierung</b>
<b>Cannabidiol</b>	99,5%	0,5 – 100,0 µg/mL Cannabidiol

Das Pflanzenmaterial wurde sowohl im unbehandelten als auch im decarboxylierten Zustand direkt in Propylenglycol mazeriert. Aus diesen Mazeraten wurden anschließend die jeweiligen Liquids hergestellt.

Die folgende Tabelle 10 stellt die flüssigchromatographische Methode zur Quantifizierung der CBD-haltigen Liquids dar.

Tabelle 10: Flüssigchromatographische Methode für die Analytik von Cannabidiol mithilfe des Hewlett Packard 1050 RP-HPLC-Systems modifiziert nach Deutschem Arzneibuch (159)

<b>Säule</b>	Agilent ZORBAX SB-C <sub>18</sub> , l = 150mm x 4,6mm, d = 3,5µm
<b>Detektor</b>	UV-Vis
<b>Detektionswellenlänge</b>	225 nm
<b>Eluent A</b>	8,64 g/L Phosphorsäure (85%) in H <sub>2</sub> O
<b>Eluent B</b>	Acetonitril
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µL
<b>Flussrate</b>	1,0 mL/min (B [%]: 80)
<b>Gradientenprogramm Eluent B</b>	20 min 75%, 21 min 80%, 22 min STOP

Vergleichende Untersuchungen unter den gegebenen Bedingungen aus dem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) wurden durchgeführt und ausgewertet. Zusätzlich wurde die Leistung der e-Zigarette anhand des CL-Liquids variiert und ausgewertet.

## 4.2.3 Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymsystemen *in vitro*

### 4.2.3.1 Biologische Suspensionen

Die Untersuchungen dienten der Prüfung des Einflusses der Liquids im flüssigen und aerosolierten Zustand gegenüber ausgewählten Enzymsystemen in biologischen Suspensionen unter Betrachtung möglicher Wechselwirkungen in Form einer Aktivitätsänderung der Enzyme. Der Fokus dieser Untersuchung lag auf der Behandlung von drei verschiedenen biologischen Suspensionen (Tabelle 11) unter definierten Bedingungen und anschließender Durchführung von Enzymaktivitäts-Assays.

Tabelle 11: Biologische Suspensionen zur Untersuchung der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymen *in vitro* modifiziert nach (164–166)

Biologische Suspension	Physiologisch relevantes Enzym	pH-Wert
<b>Synthetischer Speichel</b> Artificial human saliva (AHS)	$\alpha$ -Amylase	pH 6,75
<b>Humaner Speichel</b> Human saliva (HS)	$\alpha$ -Amylase	pH 7,0 $\pm$ 0,1
<b>Modifizierter, synthetischer Intestinalsaft</b> Modified artificial intestine fluid (mAIF)	Protease, $\alpha$ -Amylase	pH 6,8 $\pm$ 0,1

Für die Untersuchungen wurden das Basisliquid (B) sowie die jeweiligen Formulierungen mit 1% ätherischem Öl (EL, NL, ML) direkt bzw. als Aerosol mit den biologischen Suspensionen inkubiert. Die biologischen Suspensionen wurden dazu stets frisch hergestellt bzw. gesammelt. Die Aerosole wurden nach standardisiertem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) erzeugt und die jeweilige biologische Suspension in der Gaswaschflasche der Probenahme-Konstruktion bedampft. Die Variationen erfolgten in der Leistung der e-Zigarette und der Anzahl der Zyklen sowie in einer zusätzlichen Inkubation der Aerosole in der Waschflasche nach dem Bedampfen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Verdampfungsprotokolle zur Variation der Parameter der Erzeugung von Aerosolen – dargestellt sind die variablen Parameter: Leistung der e-Zigarette, Anzahl der Zyklen und Inkubation in Waschflasche nach dem Bedampfen. Konstante Parameter nach standardisiertem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) – Zugdauer: 2 Sekunden, Flussrate Pumpe: 1,5 L/min, Intervall: 30 Sekunden, Volumen biologische Suspension in Waschflasche: 1 mL

Verdampfungsprotokoll	VP1a	VP1b	VP2a	VP2b	VP3a	VP3b
<b>Leistung e-Zigarette [Watt]</b>	20	20	20	20	80	80
<b>Anzahl der Zyklen</b>	1	1	3	3	1	1
<b>Inkubation in Waschflasche nach Bedampfen [min]</b>	0	10	0	10	0	10

#### 4.2.3.2 $\alpha$ -Amylase-Assay

##### Prinzip

Das Prinzip dieser kolorimetrischen Methode beruht auf einer spezifischen Farbreaktion als Nachweisreaktion beim  $\alpha$ -Amylase-Assay nach Bernfeld (1951) und wurde ursprünglich zum Nachweis reduzierender Substanzen im Urin entwickelt (167). In Anwesenheit reduzierender Kohlenhydrate wird die Phenolsäure 3,5-Dinitrosalicylsäure zu 3-Amino-5-nitrosalicylsäure reduziert. Diese Reduktion erfolgt aufgrund der Anwesenheit des reduzierenden Zuckers Maltose. Das Enzym  $\alpha$ -Amylase spaltet die Maltose aus löslicher Stärke. Die gebildete 3-Amino-5-nitrosalicylsäure absorbiert Licht bei 540 nm und die Färbung der Lösung schlägt von orangegelb zu rot um. Mithilfe einer externen Kalibrierung mit Maltose kann die Konzentration ermittelt werden und ergibt die Enzymmenge, die unter gegebenen Bedingungen definitionsgemäß 1  $\mu$ mol Maltose aus löslicher Stärke in einer Minute freisetzt. Die verwendeten Reagenzien und ihre Herstellung sind im Anhang (8.2.3 Reagenzien für das  $\alpha$ -Amylase-Assay) dargestellt.

##### Durchführung

Für die externe Kalibrierung wurden Maltose-Lösungen im Konzentrationsbereich von 0,25 – 5,00 mmol/L eingesetzt. Vor der Untersuchung der zu betrachtenden Proben waren Verdünnungen zu tätigen, um den kalibrierten Bereich zu erfassen. Die Proben wurden bei der direkten Behandlung in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,05; 0,1 und 0,25 g/mL) sowie die erzeugten Aerosole in dreifacher Bestimmung untersucht. Die Probelösung wurde zur Substratlösung gegeben und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. In diesem Schritt wird die Stärke zu Maltose gespalten, wenn die Probelösung eine Enzymaktivität aufweist. Nach Zugabe der Farbreaenz wurde die Mischung bei 100°C weitere 5 Minuten behandelt, um das Enzym zu inaktivieren und einen standardisierten Endpunkt zu schaffen. Anschließend wurde für 40 Minuten auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Mischung konnte im Spektralphotometer bei 540 nm gemessen werden. Analog wurde die Acarbose-Lösung als Positivkontrolle zur Hemmung des Enzyms behandelt. Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der externen Kalibrierung. Die Kalibriergerade setzt die Konzentrationsgrenzen in mmol bzw.  $\mu$ mol Maltose pro mL. Die Auswertung erfolgte in Prozent Enzymaktivität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (100%).

#### 4.2.3.3 Protease-Assay

##### Prinzip

Das Prinzip dieser kolorimetrischen Methode beruht auf einer spezifischen Nachweisreaktion der Protease-Aktivität durch Azomarkierung nach Charney und Tomarelli (1947) (168). Azocasein ist ein chromophores Casein derivatisiert mit Diazoarylaminen. Es wird in Anwesenheit von proteolytischen Enzymen (z.B. Trypsin) in kleine chromophortragende, säurelösliche Peptide gespalten, die die Lösung gelb färben. Das nicht gespartene Azocasein wird in Trichloressigsäure gefällt. Nach anschließender Zentrifugation kann der Überstand im alkalischen Medium neutralisiert und photometrisch bei einer Absorption von 440 nm untersucht werden. Die Extinktionen der jeweiligen unbehandelten biologischen Suspensionen werden definiert als 100%ige Enzymaktivitäten und mit den Proben verglichen. Die verwendeten Reagenzien und ihre Herstellung sind im Anhang (8.2.4 Reagenzien für das Protease-Assay) dargestellt.

##### Durchführung

Die Proben wurden bei der direkten Behandlung der biologischen Suspensionen in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,05; 0,1 und 0,25 g/mL) sowie die erzeugten Aerosole in dreifacher Bestimmung untersucht. Die Probelösung wurde zusammen mit der Azocasein-Lösung auf 37°C temperiert und 30 Minuten lang inkubiert. Nach Zugabe der Trichloressigsäure wurde die Mischung bei Raumtemperatur weitere 5 Minuten behandelt und anschließend bei 10.000 rpm und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach der Entnahme des Überstandes und Neutralisierung mit 0,5 N NaOH erfolgte die Messung im Spektralphotometer bei einer Absorption von 440 nm. Analog wurde die unbehandelte biologische Suspension zur Auswertung als 100%ige Enzymaktivität definiert.

#### 4.2.4 Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro*

Da eine medizinische Anwendung der Technologie der e-Zigarette insbesondere bei bakteriellen Atemwegserkrankungen denkbar wäre, sollten mikrobiologische Untersuchungen zur antibakteriellen Wirkung von Modellsstoffen erfolgen. Es wurden ausgewählte Isolate von klinisch relevanten bakteriellen Krankheitserregern mit den jeweiligen Liquids behandelt bzw. bedampft und deren grundlegende Dosis-Wirkungsbeziehung charakterisiert. Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden nach den standardisierten mikrobiologischen Arbeitsanweisungen des CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) durchgeführt (169). Die jeweiligen Vorschriften wurden gegebenenfalls modifiziert und gesondert in den jeweiligen Durchführungen genannt.

##### Bakterienarten

Für die mikrobiologischen Untersuchungen wurden sechs Bakterienarten ausgewählt, die nach zwei Charakteristika gruppiert werden können. Die drei multiresistenten Bakterien können mit antibiotischen Standardtherapien nicht abgetötet werden und haben vor allem eine nosokomiale Relevanz. *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289) ist einer der am schwersten zu behandelnden nosokomialen Krankheitserreger mit hohen Sterblichkeitsraten bei Pneumonien und Bakteriämien. Bei Patienten mit Mukoviszidose kommt es zu einer langfristigen Kolonisierung der Atemwege mit *P. aeruginosa*, die mit der pulmonalen Applikation von Antibiotika wie Tobramycin behandelt wird (170). Eine ähnliche zunehmende Relevanz als Erreger von Krankenhausinfektionen hat das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245). Es verursacht hauptsächlich Infektionen der Harnwege und Atemwege, die durch eine zunehmende Multiresistenz schwer bekämpft werden können (171). Der Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA 29) wird assoziiert mit Wundinfektionen und insbesondere der Besiedlung von Schleimhäuten im Bereich der Nase und des Rachens (172). Die zweite Gruppe der Bakterienarten weist Eigenschaften auf, die vordergründig mit respiratorischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351) kann vor allem Lungenentzündungen, aber auch Mittelohr- und Hirnhautentzündungen bei einer Infektion des unteren Respirationstraktes verursachen. Eine Besiedelung des Nasen-Rachenraumes verläuft jedoch meistens symptomlos (173). Die Bakterienarten *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358) und *Haemophilus influenzae* (H.i. 361) sind zusammen mit *Streptococcus pneumoniae* repräsentativ beteiligt an Atemwegserkrankungen mit diverser Symptomatik, wie Rhinosinusitis, Tracheitis oder Bronchitis (174).

Alle Bakterienisolate stammen aus der AG Gastrointestinale Mikrobiologie des Institutes für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie der Charité in Berlin und sind in der folgenden Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 13: Charakterisierung der untersuchten sechs Bakterienarten** – dargestellt sind die Eigenschaften, die laborinterne Nummer und die Herkunft der sechs Bakterienarten: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*; NRZ = Nationales Referenzzentrum, ATCC = American Type Culture Collection, AG = Arbeitsgemeinschaft

<b>Bakterium</b>	<b>Gram-Färbung</b>	<b>Form</b>	<b>Laborinterne Nummer</b>	<b>Herkunft</b>
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	negativ	Stäbchen	289	Patientenisolat MV17775 Charité Innere Medizin
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	negativ	Stäbchen	245	NRZ-00002, NRZ Bochum
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)</b>	positiv	Kokken	29	Patientenisolat MV05662, Charité Unfallchirurgie
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i></b>	positiv	Kokken	351	BK 79062, Labor Berlin
<b><i>Moraxella catarrhalis</i></b>	negativ	Kokken	358	ATCC 25238, AG Slevogt
<b><i>Haemophilus influenzae</i></b>	negativ	Stäbchen	361	AG Slevogt

Die mikrobiologischen Untersuchungen werden aufgeteilt in direkte und indirekte Methoden, je nach Art der Untersuchung über direkten Kontakt des Liquids mit dem Bakterium oder indirekt über das jeweilige Aerosol. Dabei werden die beschriebenen Liquids aber auch die reinen Wirkstoffe und Vehikel aus Kapitel 4.1 Material untersucht. Das Antibiotikum Tobramycin (T) und das Tobramycin-Liquid (TL) dienen dabei zum Vergleich der ermittelten Werte.

#### Bakterienkultivierung

Die Bakterienkultivierung bzw. Bakterienanzucht dient zum Zweck der Vermehrung. Das Vorgehen ist im ersten Schritt für alle Untersuchungsmethoden identisch und einheitlich. Die Bakterien wurden aus der bei Raumtemperatur aufgetauten Reinkultur mithilfe einer Impföse entnommen und auf ein festes Nährmedium in einer Petrischale fraktioniert ausgestrichen. Diese beimpften Nährmedium-Platten wurden unter kontrollierten Bedingungen (24 h, 37°C, 5% CO<sub>2</sub>) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden einzelne Kolonien mit einer Impföse entnommen und in einem Flüssigmedium homogenisiert. Diese Bakteriensuspension wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm auf den

sogenannten Trübungsstandard 0,5 McFarland eingestellt. Dieses Protokoll ist standardisiert auf das Bakterium *Escherichia coli* und ergibt bei einer Absorption von 0,08 bis 0,1 eine Bakterienkonzentration von  $1-2 \cdot 10^8$  koloniebildende Einheiten (KBE) pro mL. Diese Bakteriendichte wurde in den jeweiligen mikrobiologischen Untersuchungen anschließend weiterbearbeitet. Zur Erhaltung der Reproduzierbarkeit wurden alle Untersuchungen standardisiert auf Nährmedien und -bouillons einer Bezugsquelle. So wurden die Bakterien auf industriell gefertigten Columbia-Blutagar-Festmedien und in Müller-Hinton-Flüssigmedium vermehrt. Abweichend davon wurde das Bakterium *Haemophilus influenzae* auf speziellen Kochblutagar-Platten inkubiert und das Müller-Hinton-Medium mit speziellen wachstumsfördernden *Haemophilus influenzae*-Supplementen (HI-Supplementen) erweitert. Die detaillierten Informationen zur Herstellung der Nährmedien befinden sich im Anhang (8.2.5 Flüssige Nährmedien).

#### 4.2.4.1 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Liquids (direkte Methoden)

Bei den direkten mikrobiologischen Untersuchungsmethoden handelt es sich um Methoden, in denen die Modellsubstanzen direkt in ihrem flüssigen Aggregatzustand verwendet werden. Die Eigenschaften sind demnach den Liquids bzw. seinen Bestandteilen zuzuordnen. Dies ergibt einen Überblick über die antibakteriellen Eigenschaften der eingesetzten Liquids und deren Bestandteile für den Vergleich mit den Aerosolen.

##### 4.2.4.1.1 Agardiffusionstest

###### Prinzip

Die Agardiffusion ist eine häufige qualitative Empfindlichkeitsprüfung gegenüber antimikrobiell wirkenden Substanzen und eignet sich für die meisten bakteriellen Krankheitserreger. Das Prinzip der Agardiffusion besteht auf der Bildung eines radialen Konzentrationsgradienten durch Diffusion. Ein steriles Filterpapierplättchen – eine sogenannte Suszeptibilitätsscheibe – getränkt mit der zu untersuchenden Probesubstanz wird auf eine beimpfte Agarplatte gebracht. Dieses führt zur Bildung einer Inhibitionszone auch Hemmhof genannt und ist abhängig von der aufgetragenen Probe, seiner Löslichkeit, seinem Diffusionskoeffizienten und seiner Gesamtwirkung (175).

###### Durchführung

Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) des jeweiligen Bakterienstammes wurde für den Agardiffusionstest auf eine Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^6$  KBE pro mL verdünnt. Davon wurden 100 µL auf den jeweiligen Nährboden mithilfe eines Drigalskispatels ausplattiert somit ergibt sich eine Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  KBE pro Petrischale. Anschließend wurden sterile Filterplättchen (Ø 6 mm) mittig platziert. Zur Bestimmung der Hemmhöhe wurde eine konstante Masse von 30 µg der

Proben direkt auf die Filterplättchen aufgebracht. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter aeroben Bedingungen im Brutschrank konnten die Platten visuell überprüft werden und das Ausmessen der Hemmhöhe mit dem Lineal erfolgen. Jede Untersuchungskombination wurde als dreifache Bestimmung (n = 3) erfasst.

#### 4.2.4.1.2 Mikrodilution

##### Prinzip

Eine standardisierte Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Modellsubstanzen meist Antibiotika in Routinelaboren erfolgt mit dem Mikrodilutionsverfahren. Mithilfe geometrisch verdünnter Probelösungen können antibakterielle Hemmkonzentrationen photometrisch ermittelt werden. Die niedrigste Konzentration, die die Vermehrung der Bakterien verhindert bzw. hemmt, ist die minimale Hemmkonzentration (MHK). Sie ist ein Maß der Empfindlichkeit eines Bakteriums gegenüber einem antibakteriell wirkenden Stoff und entscheidet über den Behandlungserfolg in der Klinik. Dabei zeigt eine hohe MHK eine geringere Empfindlichkeit und mögliche Resistenz des Bakteriums gegenüber der Substanz an. Die Mikrodilution hat gegenüber der Agardiffusion den Vorteil einer sensitiver quantitativen Bestimmung der antibakteriellen Wirkung (175).

##### Durchführung

Zur Ermittlung der MHK-Werte wurden 96-well (Kavitäten) Mikrotiterplatten mit Flachboden (F-Boden) verwendet. Die Abbildung 24 zeigt das standardisierte Pipettierschema. Die Probe wurde in der gewünschten höchsten Konzentration als Stammlösung hergestellt und in die erste Spalte (V1) der Mikrotiterplatte pipettiert. Die spaltenweise Verdünnung mithilfe einer Mehrkanalpipette (Eppendorf Research® plus) ermöglichte die Untersuchung in geometrischen Verdünnungsreihen (V2 - V11) mit dem Verdünnungsfaktor 0,5 (z.B. 128 g/L, 64 g/L, 32 g/L usw.) nach folgender Formel:

$$c_n = c_0 \cdot 0,5^n$$

Zusätzlich wurden Kontrollen (K1 – K11) ohne Bakteriensuspension, die Sterilkontrolle (SK), die Positivkontrolle (POS) und Negativkontrollen (NEG) auf der Platte aufgetragen. Der letzte Schritt war das Hinzufügen der Bakteriensuspension, um einen definierten Inkubationsstart zu ermöglichen. Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) des jeweiligen Bakterienstammes wurde für die Mikrodilution auf eine Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^6$  KBE pro mL verdünnt und davon 10 µL in die Kavitäten pipettiert. Somit ergab sich eine Konzentration von  $5 \cdot 10^4$  KBE pro Kavität. Da es sich bei den reinen ätherischen Ölen um sehr flüchtige Substanzen handelt, wurden diese Mikrotiterplatten mit einer sterilen Klebefolie zusätzlich zu den vorgesehenen Deckeln überklebt. Dies verhinderte nicht nur das Verdampfen der ätherischen Öle, aber auch mögliche unerwünschte Effekte auf angrenzende

Kavitäten. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> unter aeroben Bedingungen im Brutschrank erfolgte die photometrische Bestimmung mithilfe eines Mikroplatten-Readers (Tecan) bei 620 nm. Jede Untersuchungskombination wurde mindestens als siebenfache Bestimmung (n = 7) erfasst.

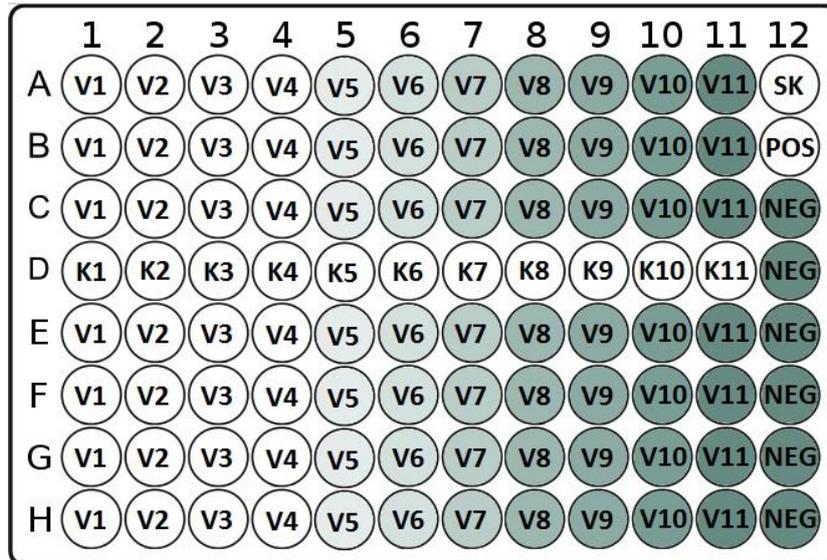


Abbildung 24: Pipettierschema der Bestimmung der antibakteriellen Aktivität der Modellsustanzen mit dem Mikrodilutionsverfahren nach CLSI – V1 = Stammlösung der Probe, V2-V11 = geometrische Verdünnungsreihe der Probe, K1-K11 = Kontrollreihe ohne Bakteriensuspension, SK = Sterilkontrolle, POS = Positivkontrolle, NEG = Negativkontrolle

#### 4.2.4.1.3 Time-Kill-Methode

##### Prinzip

Die Time-Kill-Methode ist die Erfassung der sogenannten Absterbekinetik. Es ist die Untersuchung der Aktivität eines antibakteriellen Wirkstoffs gegen einen Bakterienstamm und kann die bakterizide oder bakteriostatische Effektivität einer Substanz im zeitlichen Verlauf darstellen. Durch das Erfassen der koloniebildenden Einheiten in definierten Zeitintervallen kann eine sogenannte Absterberate graphisch dargestellt werden. Anhand dieser Vorgehensweise ist die Untersuchung der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK) ebenfalls möglich. Die MBK ist die niedrigste Konzentration, bei der nach Keimzahlbestimmung kein bakterielles Wachstum auftritt bzw. 99,9% (Reduktion um 10<sup>3</sup> KBE/mL) der Bakterien abgetötet werden (169).

##### Durchführung

Für die Bestimmung der Absterbekinetik wurden die einfachen und doppelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK und 2 x MHK) der jeweiligen Proben aus den

Mikrodilutionsuntersuchungen (siehe 5.3.1.2 Mikrodilution) zusammen mit Positiv- und Negativkontrollen gewählt. Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) des jeweiligen Bakterienstammes wurde für die Time-Kill-Methode auf eine Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^6$  KBE pro mL verdünnt. Die Ansätze wurden unter den standardisierten aeroben Inkubationsbedingungen im Brutschrank (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) für 24 Stunden in Mikroreaktionsgefäßen (2,0 mL) inkubiert. Zu den vorgesehenen Zeitpunkten 0 (t<sub>0</sub>), 3 (t<sub>1</sub>), 6 (t<sub>2</sub>) und 24 (t<sub>3</sub>) Stunden wurde den Reaktionsgefäßen jeweils ein Aliquot von 100 µL der Proben entnommen, verdünnt und ausplattiert. Diese Platten wurden ebenfalls unter den beschriebenen Standardbedingungen nochmals inkubiert und anschließend konnten die koloniebildenden Einheiten ausgezählt werden. Jede Untersuchungskombination wurde als Doppelbestimmung (n = 2) erfasst.

#### 4.2.4.2 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Aerosolen (indirektes Methoden)

Bei den indirekten Untersuchungsmethoden handelt es sich um Methoden, in denen die evaporierten Modellsubstanzen bzw. die Aerosole analysiert wurden. Die Eigenschaften sind demnach der vaporisierten Substanzen zuzuordnen. Die indirekten Methoden sind keine standardisierten Protokolle aus Routinelaboratorien. Es handelt sich um experimentelle Untersuchungen, die entweder modifiziert aus Publikationen entnommen oder selbst entworfen wurden.

##### 4.2.4.2.1 Gas-Kontakt-Methode

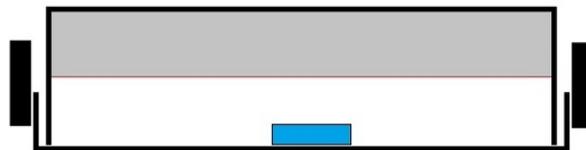
###### Prinzip

Das Prinzip der Gas-Kontakt-Methode wurde aus einer Publikation von Maruzella und Sicurella aus dem Jahr 1960 übernommen und modifiziert (176). Hierfür wurde wie bei der Agardiffusion die minimale Hemmkonzentration der Modellsubstanz gegenüber einer Bakterienart untersucht. Diese vollständige Hemmung soll jedoch durch den Kontakt der zu untersuchenden Modellsubstanz über die Gasphase herbeigeführt werden. In dieser Publikation wurden die Dämpfe von ätherischen Ölen untersucht, da herausgestellt wurde, dass die Dämpfe andere antibakterielle Eigenschaften im Vergleich zum direkten Kontakt mit der Flüssigkeit aufweisen. Die Angaben der Ergebnisse sind definiert als inhibierende Masse der Probe pro mL freies Volumen der Petrischale und werden in dieser Arbeit bezeichnet als minimale volatile Hemmkonzentration (MHK<sub>VOL</sub>).

###### Durchführung

Diese modifizierte Methode wurde an allen Modellsubstanzen untersucht. Die Berechnung der Konzentration der Probe richtete sich nach dem freien Volumen in der Petrischale im geschlossenen Zustand. Die Innenmaße einer geschlossenen Petrischale haben eine Höhe von 16 mm bei einem Durchmesser vom 86 mm. Das Volumen ist demnach 93 mL. Eine handelsübliche Agarplatte mit

Festmedium hat einen Inhalt von 22 mL verfestigter Nährlösung. Somit ergibt sich ein freies Volumen in der Petrischale von etwa 71 mL. Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) der jeweiligen Bakterienart wurde für die Gas-Kontakt-Methode auf eine Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^6$  KBE pro mL verdünnt. Davon wurden 100  $\mu$ L auf den jeweiligen Nährboden mithilfe eines Drigalskispatels ausplattiert somit ergibt sich eine Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  KBE pro Petrischale. Anschließend wurde ein steriles Filterplättchen ( $\varnothing$  6 mm oder 440 mm) mittig auf die Innenfläche des Petrischalen-Deckels platziert. Zur Bestimmung der vollständigen Hemmung wurden in geometrischen Verdünnungsschritten bis zu einer Konzentration von 16 g/L die Proben direkt auf die Filterplättchen getropft und mit der unteren Petrischale mit Nährboden als Deckel verschlossen. Die Platten wurden mit einer dehnbaren Verschlussfolie nochmals luftdicht umschlossen, wie in Abbildung 25 dargestellt. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit der reinen Nährlösung zu jeder Untersuchungsreihe inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank war die Auswertung der Hemmung möglich. Das Vorhandensein einer klaren inhibierenden Zone deutet auf eine antibakterielle Aktivität der evaporierten Modellsubstanz hin. Jede Kombination wurde als dreifache Bestimmung (n = 3) erfasst.



**Abbildung 25: Schematischer Aufbau der Gas-Kontakt-Methode (176) im Querschnitt** – In die Innenseite des Petrischalen-Deckels wird eine sterile Suszeptibilitätsscheibe platziert und mit einem definierten Volumen an Modellsubstanz betropft (blau). Die Unterseite mit inokuliertem Nährmedium (grau) dient als Deckel. Die Petrischale wird luftdicht umschlossen (schwarz) und unter standardisierten Bedingungen inkubiert.

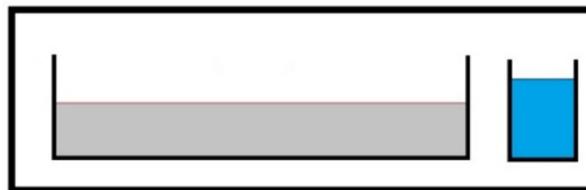
#### 4.2.4.2.2 Sättigungsbox

##### Prinzip

Das Prinzip der Sättigungsbox beruht auf einer Publikation von Inouye *et al.* aus dem Jahr 2001 (177). In dieser Publikation wurde ursprünglich die fungizide Aktivität von evaporierten ätherischen Ölen innerhalb einer luftdicht verschlossenen Box untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Sättigung eine homogene Aufnahme der ätherischen Öle in die Schicht des Nährbodens bewirkt. Für diese modifizierte Methode wurde eine luftdichte Box mit definiertem Volumen verwendet, um die Hemmung durch eine vollständige Sättigung der Atmosphäre mit der Modellsubstanz unter definierten Bedingungen herbeizuführen.

### Durchführung

Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) der jeweiligen Bakterienart wurde für die Sättigungsbox auf eine Bakterienkonzentration von  $5 \cdot 10^6$  KBE pro mL verdünnt. Davon wurden 100  $\mu$ L auf den jeweiligen Nährboden mithilfe eines Drigalskispatels ausplattiert, somit ergab sich eine Konzentration von  $5 \cdot 10^5$  KBE pro Petrischale. Anschließend wurde die Platte in eine zuvor sterilisierte Box (V = 500 mL), neben einem Glasgefäß gefüllt mit 5 mL der Modellsubstanz, platziert (Abbildung 26). Das eingesetzte Volumen wurde nach Voruntersuchungen ermittelt. Die Box wurde verschlossen, nochmals mit einer dehnbaren Verschlussfolie luftdicht umschlossen und im Ganzen im Inkubator platziert. Zusätzlich wurde eine Negativkontrolle mit flüssigem Nährmedium anstelle der Modellsubstanz zu jeder Untersuchungsreihe inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank war die visuelle Auswertung der Hemmung möglich. Jede Kombination wurde als dreifache Bestimmung (n = 3) erfasst.



**Abbildung 26: Schematischer Aufbau der Sättigungsbox (177) im Querschnitt** – Die Unterseite der Petrischale mit inokuliertem Nährmedium (grau) wird offen in einer sterilisierten Box neben einem Glasgefäß gefüllt mit Modellsubstanz (blau) platziert. Die Box wird luftdicht verschlossen und unter standardisierten Bedingungen inkubiert.

#### 4.2.4.2.3 Aerosol-Untersuchungen

##### Prinzip

Das Prinzip der Aerosol-Untersuchungen beruht auf der antibakteriellen Wirkung der Aerosole beim Durchleiten durch eine Bakteriensuspension unter definierten Bedingungen. Hierfür wurde die Probenahme-Konstruktion verwendet, um die antibakterielle Hemmung einer Bakterienart im zeitlichen Verlauf zu dokumentieren. Die konstante Flussrate ermöglichte eine gleichmäßige Aerosolgewinnung und standardisierte Probenahme. Das Ziel dieser Untersuchung war demnach eine Abnahme der koloniebildenden Einheiten mit jeder Probenahme und somit eine sichtbare Hemmung bzw. Bakterizidie hervorgerufen durch das Aerosol der jeweiligen Modellsubstanzen.

##### Durchführung

Zur Ermittlung der bakteriellen Hemmung durch das Durchleiten von Aerosol im zeitlichen Verlauf wurde die Probenahme-Konstruktion (Abbildung 20) verwendet. Die Auswahl der Modellsubstanzen

und Bakterienarten wurde anhand der vorhergehenden Ergebnisse aus den direkten und indirekten Methoden bestimmt. Hierfür wurden drei Bakterienarten mit jeweils zwei Liquids mit den für das jeweilige Bakterium niedrigsten minimalen Hemmkonzentrationen und dem wirkstofffreien Basisliquid zum Vergleich behandelt. Der eingestellte Trübungsstandard (0,5 McFarland) des jeweiligen Bakterienstammes wurde für die Aerosol-Untersuchungen individuell verdünnt. Ein Volumen von 10 mL der Bakteriensuspension wurde in die Probenahme-Waschflasche gefüllt und unter definierten Bedingungen nach Verdampfungsprotokoll behandelt. Die Proben konnten direkt aus dieser Suspension jeweils nach jedem Zyklus (10 Züge) entnommen und ausplattiert werden. Die Anzahl der Zyklen wurde über die Ermittlung einer vollständigen Inhibierung bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von 20 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank unter aeroben Bedingungen war die Auszählung der koloniebildenden Einheiten möglich. Die ermittelten Ergebnisse werden dargestellt als koloniebildende Einheiten nach der Anzahl der Züge im zeitlichen Verlauf. Jede Untersuchungskombination wurde als zweifache Bestimmung (n = 2) erfasst.

#### 4.2.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Programm GraphPad Prism 5. Die Daten werden über den Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt. Die jeweilige Anzahl der Untersuchungen (n) ist entsprechend angegeben. Signifikante Unterschiede wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Die angewandten Post-hoc-Tests Bonferroni, Dunnett und Tukey werden entsprechend genannt und mit einem Konfidenzintervall von 95% ermittelt. Die Signifikanzen sind durch Asteriske gekennzeichnet und werden bewertet als signifikantes (\* p < 0,05), sehr signifikantes (\*\* p ≤ 0,01) oder hoch signifikantes Ergebnis (\*\*\*) p ≤ 0,001).

## 5. Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Quantitative und qualitative Untersuchungen der Liquids bzw. Aerosole

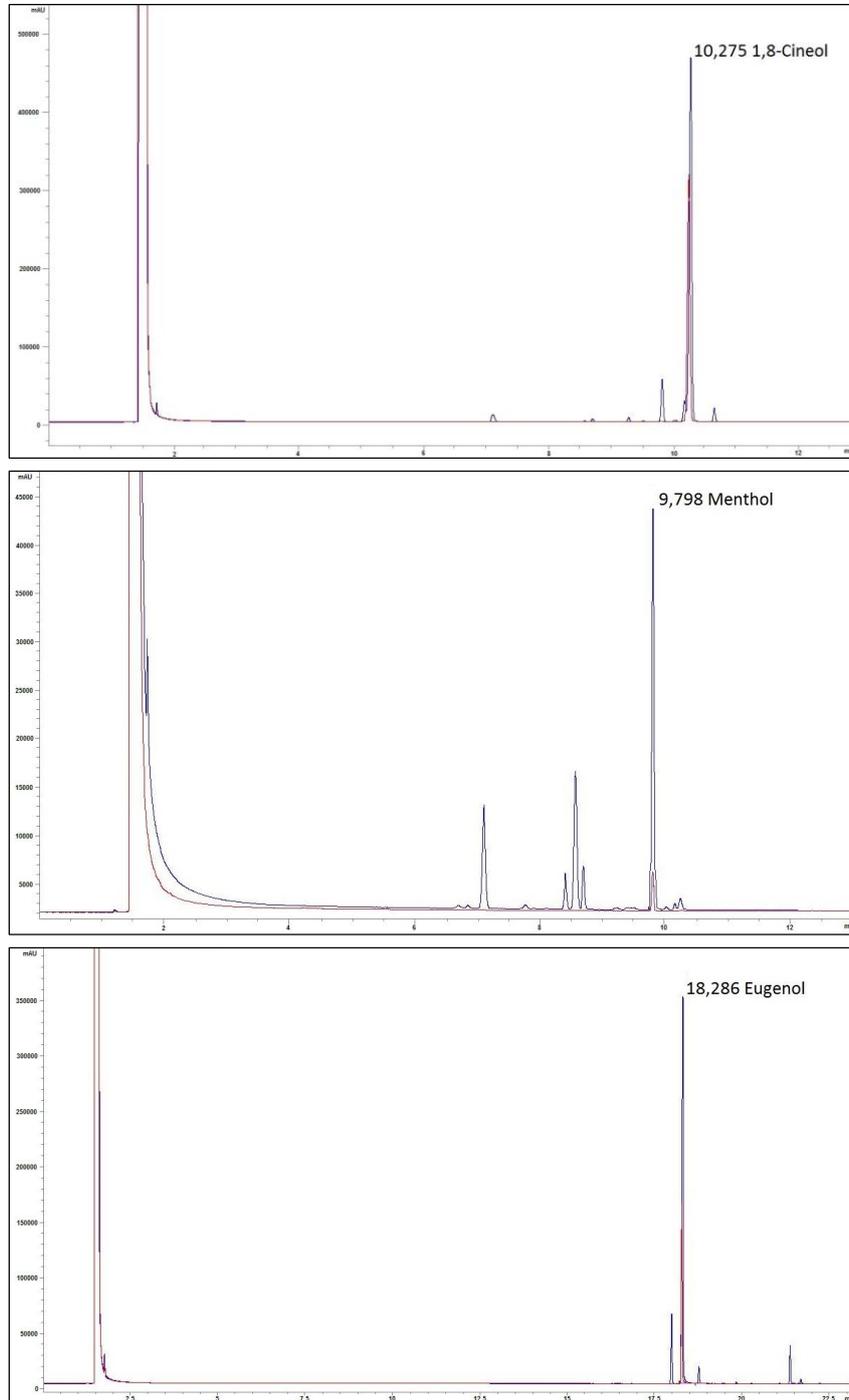
Die chromatographischen Methoden wurden unter den vorgestellten Bedingungen validiert. Die Ergebnisse der Validierungen befinden sich im Anhang (8.3 Validierung der chromatographischen Methoden). Die Ergebnisse teilen sich zum einen in die gaschromatographischen Untersuchungen der Liquids mit den ätherischen Ölen Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl. In den HPLC-Untersuchungen wurden zum anderen die Liquids anhand des Wirkstoffes Cannabidiol quantifiziert. Hierfür wurde sowohl die reine Substanz als auch Cannabis-Extrakte zur Herstellung der Liquids verwendet.

Die Quantifizierung erfolgte über eine Kalibrierung mit den externen Standards 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol. Zunächst wurden die Konzentrationen der jeweiligen Leitsubstanzen in den ätherischen Ölen mit den Angaben der Analysenzertifikate (AZ) bestätigt. Die Ergebnisse der Linearität sowie die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind in folgender Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ergebnisse der Linearität und Nachweis-(LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) der Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol der ätherischen Öle – LOD = Limit of Detection, LOQ = Limit of Quantification,  $c_{LS}$  = Konzentration der Leitsubstanz nach Analysenzertifikat, AZ = Analysenzertifikat

Standard-substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Bestimmtheitsmaß $R^2$	Ätherisches Öl	LOD [ $\mu\text{g/mL}$ ]	LOQ [ $\mu\text{g/mL}$ ]	$c_{LS}$ AZ [%]
1,8-Cineol	200535	3528	0,999	Eucalyptusöl	1,5	5,0	80,2
Menthol	2557,4	-26,4	0,999	Minzöl	1,5	5,1	32,2
Eugenol	140902	-5016	0,998	Nelkenöl	2,1	7,1	81,4

In Abbildung 27 sind die chromatographischen Profile der ätherischen Öle mit den Retentionszeiten ihrer Leitsubstanzen dargestellt.



**Abbildung 27: Chromatographische Darstellung der ätherischen Öle und ihrer Leitsubstanzen** – dargestellt sind die chromatographischen Profile der ätherischen Öle Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl mit den Retentionszeiten ihrer markierten zugehörigen Leitsubstanzen 1,8-Cineol (RT = 10,275 min), Menthol (RT = 9,798 min) und Eugenol (RT = 18,286 min); GC-Bedingungen: Kapillarsäule RTX 35 mit Vorsäule, Temperaturprogramm: 3 min 50°C, 25 min 226 °C (8°C/min), 26,4 min 260°C (25°C/min), 36,4 min 260°C, Detektion: Flammenionisation; RT = Retentionszeit

Die Liquids wurden in drei unterschiedlichen Konzentrationen an ätherischen Ölen (0,5%, 1,0%, 1,5%) in Basisliquid hergestellt. Unter pharmazeutischen Aspekten kann das Liquid als Arzneimittel betrachtet werden. Der phytopharmazeutische Wirkstoff ist demnach das jeweilige ätherische Öl dessen Gehalt an Leitsubstanzen quantifiziert werden muss. Anhand von Qualitätsstandards sogenannten Spezifikationen wird die pharmazeutische Qualität beurteilt. Diese Spezifikationen müssen im Bereich zwischen 95% und 105% liegen, um ein Arzneimittel als Arzneimittelhersteller freigeben zu dürfen. Die Tabelle 15 verdeutlicht die jeweiligen Soll-Konzentrationen ( $c_{\text{Soll}}$ ) der Leitsubstanzen in den jeweiligen Liquids mit den ermittelten prozentualen Wiederfindungsraten.

**Tabelle 15: Ergebnisse der gaschromatographischen Untersuchung der Leitsubstanzen in den Liquids** – dargestellt sind die Wiederfindungsraten in Prozent der jeweiligen Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol in den Liquids EL, ML und NL. Die Soll-Konzentrationen ( $c_{\text{Soll}}$ ) werden berechnet anhand der Konzentration der Leitsubstanz im ätherischen Öl und anhand der Konzentration des ätherischen Öls im jeweiligen Liquid. Die Liquids wurden in drei verschiedenen Konzentrationen an ätherischen Ölen hergestellt. EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid,  $c_{\text{Soll}}$  = Soll-Konzentration der Leitsubstanz im Liquid (n = 3)

Liquid	Abkürzung	Leitsubstanz	$c_{\text{Soll}}$ [mg/mL]	Wiederfindungsrate [%]
Eucalyptusöl-Liquid	EL0,5	1.8-Cineol	4,55	100,9
	EL		9,21	103,0
	EL1,5		13,51	101,3
Minzöl-Liquid	ML0,5	Menthol	1,85	100,2
	ML		3,64	99,9
	ML1,5		5,41	100,1
Nelkenöl-Liquid	NL0,5	Eugenol	4,60	101,0
	NL		9,16	103,0
	NL1,5		13,75	97,3

Die Konzentrationen der ätherischen Öle im Liquid wurden bei 0,5%, 1,0% und 1,5% gewählt. Die daraus berechneten Konzentrationen der jeweiligen Leitsubstanzen im Liquid konnten alle zufriedenstellend quantifiziert werden. Die Wiederfindungsraten von 1,8-Cineol in den Eucalyptusöl-Liquids liegen im Bereich zwischen 100,9% und 103,0%. Das Menthol konnte in den Minzöl-Liquids zu 99,9% bis 100,2% wiedergefunden werden. Die Wiederfindungsrate der Leitsubstanz Eugenol weist die größten Schwankungen zwischen 97,3% und 103,0% auf. Die Wiederfindungen der Leitsubstanzen liegen bei allen untersuchten Liquids im Bereich der Spezifikationen des Europäischen Arzneibuchs bei  $\pm 5\%$  der eingesetzten Konzentrationen.

Die Aerosol-Untersuchungen wurden anhand der eigenen Probenahme-Konstruktion (Abbildung 20) und des Verdampfungsprotokolls (Tabelle 5) durchgeführt. Hierfür wurden die Aerosole durch 2-Propanol durchgeleitet und somit gelöst. Die Quantifizierung der Leitsubstanzen in den Aerosolen erfolgte direkt und ohne weitere Schritte der Probenaufbereitung. Die Abbildung 28 stellt die verdampfte Masse der Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol pro Zug in  $\mu\text{g}$  graphisch dar.

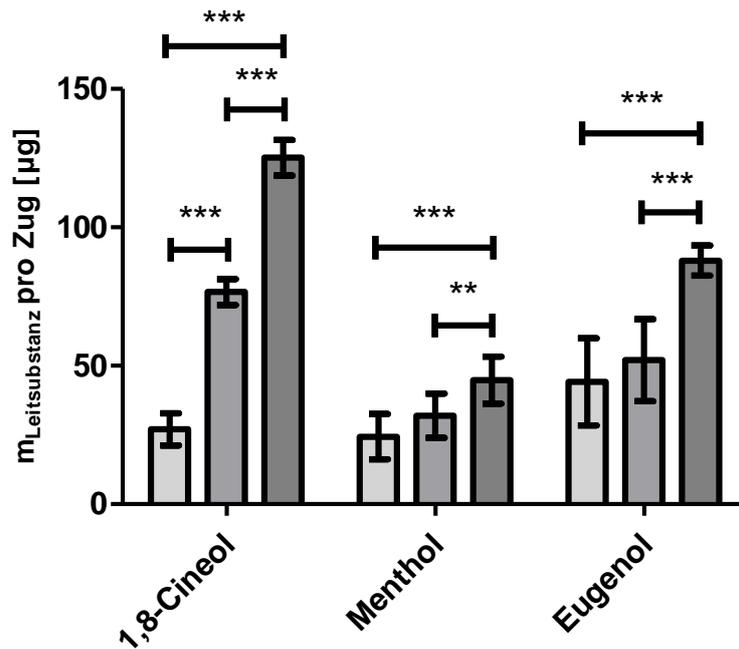


Abbildung 28: Ergebnisse der gaschromatographischen Verdampfungsuntersuchungen der Leitsubstanzen in Aerosolen nach Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) – Chromatographische Quantifizierung der verdampften Masse der Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol pro Zug in  $\mu\text{g}$  bei 20 Watt. Die Liquids enthalten drei unterschiedliche Konzentrationen an den jeweiligen ätherischen Ölen (■ = 0,5%; ■ = 1,0%; ■ = 1,5%); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Bonferroni \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , ( $n = 9$ )

Die gemittelten verdampften Massen des 1,8-Cineols in Höhe von 33,6  $\mu\text{g}$  (0,5%), 95,6  $\mu\text{g}$  (1,0%) und 156,2  $\mu\text{g}$  (1,5%) unterscheiden sich in den drei untersuchten Konzentrationen signifikant ( $p \leq 0,001$ ) voneinander. Die verdampften Massen von Menthol wurden bei 25,0  $\mu\text{g}$  (0,5%), 32,0  $\mu\text{g}$  (1,0%) und 45,0  $\mu\text{g}$  (1,5%) ermittelt, wohingegen das Eugenol unter den gegebenen Parametern des Verdampfungsprotokolls die Massen 45,4  $\mu\text{g}$  (0,5%), 54,4  $\mu\text{g}$  (1,0%) und 108,0  $\mu\text{g}$  (1,5%) aufzeigt. Die verdampfte Masse von Menthol weist erst ab einer Konzentration in Höhe von 1,5% Minzöl im Liquid signifikante Unterschiede zu den anderen beiden Konzentrationen auf. Dieses trifft ebenfalls auf Eugenol zu. Die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung der Leitsubstanzen scheinen einen linearen Zusammenhang zwischen der Konzentration des ätherischen Öles im Liquid und der verdampften Masse der Leitsubstanz aufzuweisen. Das heißt, wird die Masse der Leitsubstanz im

Liquid erhöht, steigt ihre verdampfte Masse prozentual an. Die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes  $R^2$  über eine lineare Regression gibt Aufschluss über einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen den Variablen. Für die lineare Anpassung des 1,8-Cineols liegt dieses Bestimmtheitsmaß  $R^2$  bei 1 bzw. 100%. Die Bestimmtheitsmaße von Menthol und Eugenol liegen bei 0,980 bzw. 0,875. Somit kann die Behauptung aufgestellt werden, dass die Leitsubstanzen der ätherischen Öle in Konzentrationen zwischen 0,5% und 1,5% in Basisliquid ein lineares bzw. annähernd lineares Verdampfungsverhalten nach den Parametern aus dem Verdampfungsprotokoll aufzeigen. Das Diagramm verdeutlicht ebenfalls, dass das Verdampfungsverhalten innerhalb der Leitsubstanzen sehr unterschiedlich sein kann. Diese Bestandteile von Vielstoffgemische haben ungeachtet der überwiegend terpenoiden Strukturen sehr unterschiedliche physikalische Eigenschaften. In Tabelle 16 sind thermodynamische Stoffeigenschaften der reinen Leitsubstanzen dargestellt.

**Tabelle 16: Thermodynamische Charakterisierung der Leitsubstanzen (178, 179)** – dargestellt sind die physikalischen Parameter Siedepunkt, die Verdampfungsenthalpie und der Dampfdruck der reinen Leitsubstanzen 1,8-Cineol, Menthol und Eugenol und ihre prozentualen Anteile in den jeweiligen ätherischen Ölen bzw. Liquids; EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid

<b>Substanz</b>	<b>Siedepunkt [°C]</b>	<b>Verdampfungs-enthalpie <math>\Delta H_v</math> [kJ/mol] bei 25°C</b>	<b>Dampfdruck [Pa] bei 25°C</b>	<b>Anteil im Liquid [%]</b>	<b>Anteil im ätherischen Öl [%]</b>
<b>1,8-Cineol</b>	190	48,95	256,65	0,80 (EL)	80,2
<b>Menthol</b>	221	56,56	14,66	0,32 (ML)	32,2
<b>Eugenol</b>	253	66,31	2,95	0,81 (NL)	81,4

Unter der Annahme, dass die Umgebungsbedingungen der Leitsubstanzen konstant sind, können die physikalischen Parameter betrachtet werden. Die Siedepunkte der Substanzen begründen das unterschiedliche Verdampfungsverhalten. Das 1,8-Cineol hat dabei die niedrigste Siedetemperatur (190°C) jedoch die höchste Verdampfungsrate im Vergleich zu den anderen Leitsubstanzen. Die Energie, die benötigt wird, um eine Flüssigkeit zu verdampfen, wird als Verdampfungsenthalpie  $\Delta H_v$  bezeichnet. Mit steigendem Druck und steigender Temperatur nimmt die Verdampfungsenthalpie ab, sodass die Werte in der Tabelle 16 auf 25°C standardisiert sind. Bei einer Verdampfung mithilfe einer e-Zigarette liegen diese Werte jedoch tendenziell weit niedriger. Ungeachtet dessen sollten die Verhältnisse der Werte zwischen den Leitsubstanzen bestehen bleiben und 1,8-Cineol benötigt somit die geringste Energiezufuhr zum Überführen in den gasförmigen Zustand. Der Dampfdruck ist in einem offenen System, der Druck unterhalb dessen eine Flüssigkeit zu sieden beginnt. Der vergleichsweise hohe Wert des 1,8-Cineols (256,65 Pa) begründet ebenfalls die höchste Verdampfungsrate pro Zug.

Der prozentuale Anteil von Menthol im Liquid ist niedriger verglichen mit den anderen Leitsubstanzen. Dieses muss ebenfalls berücksichtigt werden, da das Menthol geringere verdampfte Massen im Vergleich zum Eugenol aufweist, obwohl die physikalischen Parameter auf eine höhere Verdampfungsrate hindeuten. Andere Komponenten der ätherischen Öle sowie die Vehikel, die hier als Konstanten angenommen wurden, werden jedoch ebenfalls das Verdampfungsverhalten der Leitsubstanzen beeinflussen.

Für die Untersuchung der gesamten verdampften Masse wurde die e-Zigarette vor und nach jedem Zyklus (10 Züge) gewogen. Die Abbildung 29 stellt die Massenbestimmung der gesamten verdampften Masse der jeweiligen Liquids bei 20 Watt dar.

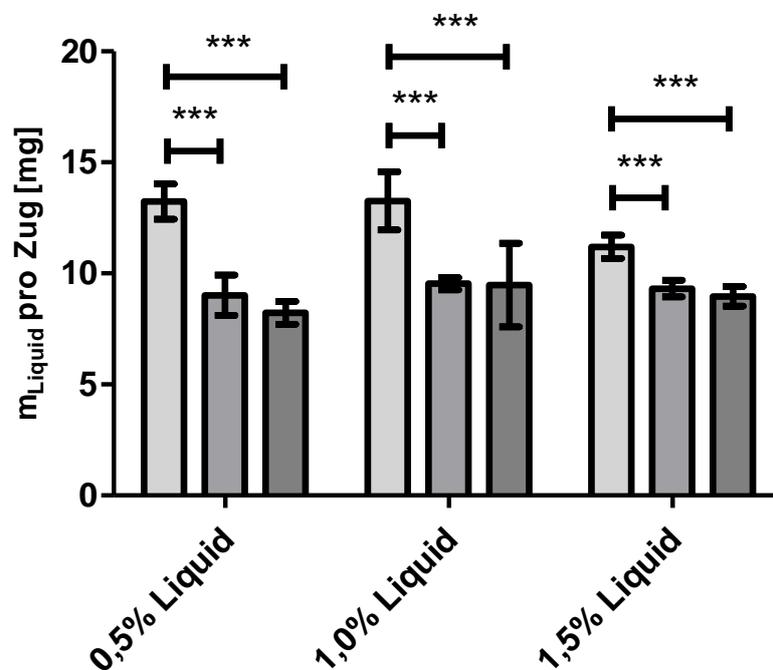


Abbildung 29: Ergebnisse der Massenbestimmung der jeweiligen Liquids in Aerosolen nach Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) – Massenbestimmung der gesamten verdampften Masse der Liquids mit ätherischen Ölen pro Zug in mg bei 20 Watt; Liquids in drei unterschiedlichen Konzentrationen (0,5%, 1,0%, 1,5%) an ätherischen Ölen (■ = Eucalyptusöl; ■ = Minzöl; ■ = Nelkenöl); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Bonferroni \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ , (n = 9)

Auch die bestimmten Massendifferenzen weisen auf signifikante Unterschiede hin. Hier sind allerdings diese signifikanten Unterschiede ( $p \leq 0,001$ ) an den Eucalyptusöl-Liquids zu den beiden anderen Liquids in allen Konzentrationen deutlich. In zwei Publikationen von Soulet *et al.* zur Untersuchung von standardisierten Verdampfungsprotokollen und Maschinen konnte die bestimmte Gesamtmasse

(15 Watt) eines nicotinhaltigen Liquids bei einem Volumen von 55 mL Aerosol und einer Zugdauer von 4 Sekunden bei 13 mg pro Zug bzw. bei einer Zugdauer von 3 Sekunden und einer Zuggeschwindigkeit von 1,11 L/min bei 10,1 mg und 8,8 mg pro Zug ermittelt werden (180, 181). Diese verdampften Massen sind vergleichbar mit den ermittelten Werten aus Abbildung 29. Wie bereits in Kapitel 4.2.1.1 Technologie der elektronischen Zigarette (e-Zigarette) beschrieben, wurde für jedes Liquid desselben ätherischen Öles ein eigener Tank verwendet. Die Ergebnisse der Massenbestimmung deuten darauf hin, dass die Gleichförmigkeit der Masse der abgegebenen Dosis nach Europäischem Arzneibuch bei Austausch der Tanks nicht gewährleistet werden kann. Während der Probenahme wurde darauf geachtet zwischen den Zyklen die e-Zigarette nicht zu überhitzen. Das Liquid im Tank wurde für jeden Zyklus frisch ausgetauscht, um mögliche Konzentrationsunterschiede aufgrund der Erhitzung zu vermeiden. Die Wägung folgte zeitlich sofort nach der Probenahme, so dass Verluste aufgrund von Verflüchtigungen weitestgehend ausgeschlossen werden können. Eine gründliche Reinigung bzw. häufiger Austausch der Verdampfereinheit minimierte potentielle Konzentrationsschwankungen aufgrund von Rückständen. Mögliche Gründe für Unterschiede im Verdampfungsverhalten können fehlende Konformitäten während der Produktion einzelner Bauteile sein. Da es sich um ein Massenprodukt handelt, können nur Stichproben geprüft werden, sodass Schwankungen nicht auszuschließen sind. Die Technologie der e-Zigarette und ihre Bauweise wurde bereits erläutert (siehe Kapitel 4.2.1.1 Technologie der elektronischen Zigarette (e-Zigarette)). Die Vorrichtung zur Belüftung, die unter dem Tank in dem verwendeten Modell platziert ist, wird manuell eingestellt. Diese Luftstromregulierung (siehe Abbildung 18) wird jedoch sehr leichtgängig mit steigender Temperatur, sodass ein Verrutschen während der Probenahme nicht auszuschließen ist. Eine vermehrte Luftzufuhr hätte eine Verdünnung des Aerosols und damit eine Verdünnung des Wirkstoffes im Aerosol zur Folge. Dennoch ist dies nur eine Erklärung zu technischen Defekten innerhalb einer Vorrichtung, die zu zufälligen Fehlern führen kann. Die Probenahme-Konstruktion wurde vor jeder Untersuchung auf Dichtigkeit geprüft, somit können mögliche Verluste ausgeschlossen werden. Abgesehen von den Materialien der Konstruktion aus Glas, wurden chemisch inerte PVC-Schläuche verwendet. Diese Verbindungen wurden so kurz wie möglich gehalten, jedoch konnte eine Kondensatbildung innerhalb der Schläuche nicht verhindert werden. Dieses ist jedoch als systematischer Fehler zu deuten und sollte in allen Untersuchungsreihen gleich bewertet werden, denn das standardisierte Protokoll wurde streng eingehalten.

Am Beispiel des Eucalyptusöl-Liquids (EL) wurde die Leistung der e-Zigarette näher betrachtet. Das Modell konnte manuell in der Leistung (20 – 80 Watt) angepasst werden. Wie in den vorhergehenden Untersuchungen wurde hier auf ausreichende Pausen zwischen den Probenahmen geachtet und das Liquid frisch aufgefüllt. Die Abbildung 30 stellt die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Leistung auf das Verdampfungsverhalten der Leitsubstanz 1,8-Cineol im Eucalyptusöl-Liquid (EL) zwischen 20 und 80 Watt dar.

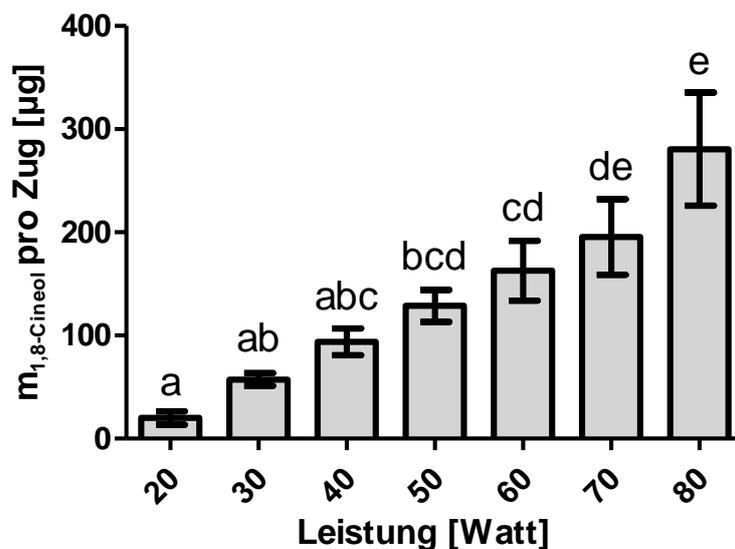


Abbildung 30: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Leistung der e-Zigarette auf das Verdampfungsverhalten von 1,8-Cineol – Chromatographische Bestimmung der verdampften Masse der Leitsubstanz 1,8-Cineol pro Zug in µg; Mittelwert ± Standardabweichung; Kennbuchstaben (a - e) unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau (n = 3)

Die Freisetzungsrates von 1,8-Cineol verhält sich linear zum Anstieg der Leistung der e-Zigarette. Die Kennbuchstaben (a - e) über den Säulen unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau. Die ermittelten Freisetzungen lagen bei 20,0 ± 6,4 µg (20 Watt), 57,3 ± 6,3 µg (30 Watt), 93,9 ± 13,0 µg (40 Watt), 128,8 ± 15,5 µg (50 Watt), 162,8 ± 28,9 µg (60 Watt), 195,5 ± 36,6 µg (70 Watt) und 280,6 ± 54,9 µg (80 Watt) 1,8-Cineol pro Zug. Eine Erhöhung der Leistung führte zu einem Anstieg der Standardabweichung. Die damit einhergehende Temperaturerhöhung kann Schwankungen in der Verdampfungsrate verursachen, da die e-Zigarette sich ungleichmäßig aufheizt. Eine Probenahme bei 20 Watt führte zu einer minimalen Erwärmung des Gerätes über den gesamten Zyklus. Wohingegen die Untersuchung bei einer Leistung von 80 Watt stufenweise eine Erhitzung verursachte, die eine unangenehme manuelle Anwendung bewirkte. Die inhalative Anwendung über ein kurzes Mundstück (siehe Abbildung 18) kann somit zu einer Verbrennung führen. Die Zertifizierung als

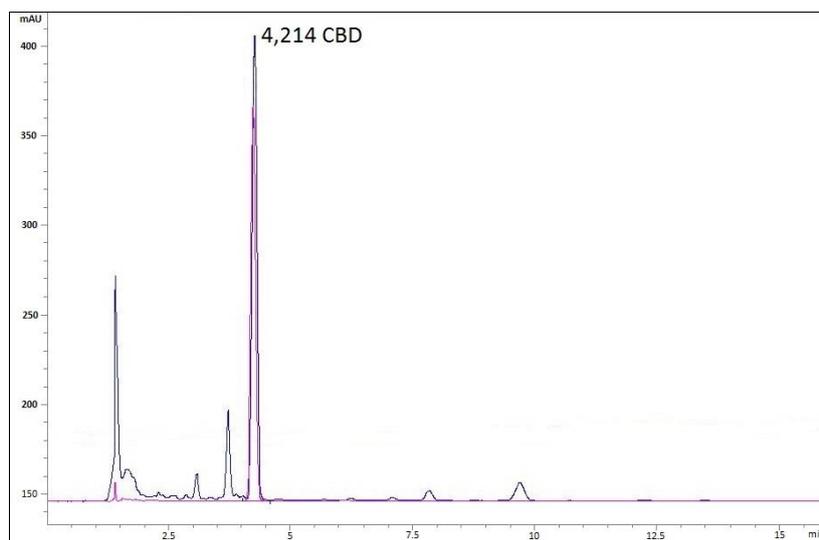
Medizinprodukt wäre aus Sicherheitsaspekten nicht möglich. Eine anwenderindividuelle Variation der Leistung kann die Gleichförmigkeit der abgegebenen Dosis des Inhalators nicht gewährleisten. Die Einschränkung einer festen Leistung muss gerätetechnisch realisiert werden. Die Kondensatbildung in den Schläuchen der Apparatur stieg visuell quantitativ an mit Zunahme der Leistung der e-Zigarette. Ab einer Leistung von 60 Watt war die Tröpfchenbildung so stark, dass ein Zurückfließen in den Tank beobachtet werden konnte. Dieses Kondensat verdünnte wiederum das Liquid im Tank und verursachte die verhältnismäßig höheren Standardabweichungen der untersuchten Leistungen zwischen 60 und 80 Watt.

Zur Untersuchung der Modellsubstanz Cannabidiol wurde eine RP-HPLC Methode validiert. Die Ergebnisse der Validierung befinden sich im Anhang (8.3 Validierung der chromatographischen Methoden). Die Ergebnisse der Linearität sowie die Nachweis- (LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) sind in folgender Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Ergebnisse der Linearität und Nachweis-(LOD) und Bestimmungsgrenzen (LOQ) von Cannabidiol –**  
LOD = Limit of Detection, LOQ = Limit of Quantification

Substanz	Steigung	Achsenabschnitt	Bestimmtheitsmaß R <sup>2</sup>	LOD [µg/mL]	LOQ [µg/mL]
<b>Cannabidiol</b>	45,562	10,233	0,999	0,05	0,17

Die Abbildung 31 stellt das chromatographische Profil eines Cannabis-Extraktes zusammen mit der Retentionszeit der Leitsubstanz Cannabidiol dar.



**Abbildung 31: Chromatographische Darstellung von Cannabidiol und des Cannabis-Extraktes BD (dec)** - dargestellt ist das chromatographische Profil des Cannabis-Extraktes BD (dec) mit der markierten zugehörigen Retentionszeit der Leitsubstanz Cannabidiol (RT = 4,214 min), RP-HPLC Bedingungen: Säule; Zorbax SB-C<sub>18</sub>, Gradientenelution mit 8,64 g/L Phosphorsäure (85%) in H<sub>2</sub>O als Eluent A und Acetonitril als Eluent B, Flussrate: 1,0 mL/min, Detektion: 225 nm; CBD = Cannabidiol, BD = Blue Dream, dec = decarboxyliert, RT = Retentionszeit

Zur quantitativen Untersuchung wurden fünf unterschiedliche Liquids hergestellt. Ein Liquid mit 0,5% reinem Cannabidiol (CL) und vier Mazerate aus decarboxyliertem (dec) und nicht decarboxyliertem (ndec) pflanzlichem Material (Antal-L und BD-L). Die Decarboxylierung des pflanzlichen Materials erfolgte bei 100°C für drei Stunden. Für die Gehaltbestimmung des Cannabidiols in der Rohdroge wurde aus decarboxyliertem und unbehandeltem (ndec) Pflanzenmaterial ein ethanolischer Extrakt nach Deutschem Arzneibuch hergestellt. Die Tabelle 18 stellt die Ergebnisse der CBD-Konzentrationen der Rohdrogen (Tabelle 4) dar.

**Tabelle 18: Ergebnisse der chromatographischen Analyse der CBD-haltigen Rohdrogen** – Die decarboxylierten Rohdrogen wurden vor der Verarbeitung bei 100°C für drei Stunden einer Hitzebehandlung unterzogen. Aus diesem decarboxylierten und dem unbehandelten (ndec) Pflanzenmaterial wurden ethanolische Extrakte (Tabelle 4) hergestellt. Die Bestimmung des CBD-Gehalts erfolgte anhand der Kalibrierung mit der externen Standardsubstanz CBD. dec = decarboxyliert ndec = nicht decarboxyliert, CBD = Cannabidiol, Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) (n = 3)

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konzentration Cannabidiol (MW ± SD)</b>	
<b>Rohdroge</b>	<b>[mg/g Pflanzenmaterial]</b>	
<b>Antal</b>	ndec	1,55 ± 0,14
	dec	6,39 ± 0,44
<b>Blue Dream</b>	ndec	9,08 ± 0,10
	dec	11,62 ± 0,68

Die Hitzebehandlung des pflanzlichen Materials führte bei beiden Cannabissorten zu signifikant höheren Konzentrationen an CBD. Die Rohdroge Antal hatte eine Steigerung der Cannabidiol-Konzentration um 412%, wohingegen die Sorte Blue Dream einen Anstieg um 128% aufwies. Cannabinoide Verbindungen kommen in Pflanzen überwiegend als carboxylierte Verbindung vor. Diese pharmakologisch unwirksamen Säuren müssen in Form einer Hitzebehandlung decarboxyliert werden. In der Praxis geschieht dies bei der Verbrennung des Pflanzenmaterials während der Inhalation. Der Anstieg der CBD-Konzentration ist somit die Reaktion der Cannabidiolsäure (CBDA) zu Cannabidiol.

Im ersten Schritt zur Herstellung der CBD-haltigen Liquids wurde das pflanzliche Material 24 Stunden lang direkt in Propylenglycol, der Hauptkomponente des Liquids, mazeriert. Anschließend wurden im zweiten Herstellungsschritt die Liquids aus 50% der jeweiligen Filtrate der Mazerate, 40% Glycerin und 10% Wasser (HPLC-grade) hergestellt. Analog zu den Liquids EL, ML und NL wurde das 0,5%-haltige CBD-Liquid (CL) hergestellt.

Die Tabelle 19 stellt die Ergebnisse der Konzentrationen von Cannabidiol in den beiden Herstellungsschritten der Liquids (Tabelle 4) dar.

**Tabelle 19: Ergebnisse der chromatographischen Analyse der Herstellungsschritte CBD-haltiger Liquids** – dargestellt sind die CBD-Gehalte der Mazerate und der Liquids. Die Rohdrogen wurden vor der Verarbeitung bei 100°C für drei Stunden einer Hitzebehandlung unterzogen. Aus diesem decarboxylierten und dem unbehandelten (ndec) Pflanzenmaterial wurden Mazerate in Propylenglycol hergestellt. Die Liquids wurden aus 50% der jeweiligen Mazerate, 40% Glycerin und 10% H<sub>2</sub>O hergestellt. Analog zu den gaschromatographisch untersuchten Liquids wurde ein 0,5%-haltiges CBD-Liquid hergestellt. Nach jedem Herstellungsschritt erfolgte eine Gehaltsbestimmung. Unter der Annahme einer 100%igen ethanolischen Extraktion der Rohdroge (Tabelle 4) wird die Extraktionsausbeute in Prozent berechnet. dec = decarboxyliert ndec = nicht decarboxyliert, Antal-L = Rohdroge Antal zum Liquid verarbeitet, BD-L = Rohdroge Blue Dream zum Liquid verarbeitet, CL = 0,5% Cannabidiol-Liquid, Mittelwert (MW) ± Standardabweichung (SD) (n = 3)

<b>Bezeichnung</b>		<b>Konzentration Cannabidiol (MW ± SD)</b>	<b>Extraktionsausbeute [%]</b>
<b>Mazerat</b>		[µg/g Propylenglycol]	
<b>Antal</b>	ndec	31,28 ± 0,03	7,1
	dec	193,67 ± 1,21	10,6
<b>Blue Dream</b>	ndec	780,79 ± 4,13	43,0
	dec	1430,7 ± 0,87	61,6
<b>Liquid aus Rohdroge</b>		[µg/g Liquid]	
<b>Antal-L</b>	ndec	30,61 ± 0,15	13,8
	dec	175,48 ± 0,44	19,2
<b>BD-L</b>	ndec	431,88 ± 3,51	47,6
	dec	916,23 ± 0,96	78,8
<b>Liquid aus CBD</b>		[µg/g Liquid]	
<b>CL</b>	/	5120 ± 290	/

Unter der Annahme einer 100%igen Extraktion des Cannabidiols aus der Rohdroge im ethanolischen Extrakt wird die Ausbeute der Extraktion mit Propylenglycol errechnet. Während der Verarbeitung zu einem Liquid wurde das homogenisierte Pflanzenmaterial 24 Stunden lang in Propylenglycol mazeriert. Durch diese schonende Behandlung sollte das CBD-CBDA-Verhältnis möglichst konstant gehalten werden. Das Propylenglycol wurde als Extraktionsmittel gewählt, um keine weiteren Verarbeitungsschritte des Extraktes bei der Herstellung zum Liquid durchführen zu müssen und somit Verlusten entgegenzuwirken. In das Liquid sollten ebenfalls keine weiteren Komponenten hinzugefügt werden, auch wenn das Propylenglycol kein optimales Lösungsvermögen bezüglich des zu lösenden Cannabidiols aufweist. Die lange Mazeration führte jedoch zur Umsetzung von CBDA zu CBD, da dies

ein automatisch ablaufender Prozess ist (182). Die Extraktionsausbeute im Vergleich zur ethanolischen Extraktion ist bei dem Antal-Mazerat 7,1% (ndec) bzw. 10,6% (dec) und bei dem Blue Dream-Mazerat 42,0% (ndec) bzw. 61,6% (dec). Die Vakuumfiltration der Mazerate und die anschließende Verarbeitung zu einem Liquid erhöhte die Ausbeute ein wenig, jedoch liegt sie weit unterhalb der ethanolischen Extraktion. Das CBD-CBDA-Verhältnis wurde demnach durch die Behandlung nochmals verändert. Die abschließenden Extraktionsausbeuten der Liquids sind für das Antal-Liquid 13,8% (ndec) bzw. 19,2% (dec) und für das BD-Liquid 47,6% (ndec) bzw. 78,8% (dec). Die Möglichkeit von Wechselwirkungen zwischen pflanzlichem Material und Bestandteilen des Liquids ist nichtsdestotrotz wahrscheinlich und führt zu Konzentrationsschwankungen in allen Herstellungsschritten, so dass in den decarboxylierten Liquids die CBD-Konzentrationen um 573% (Antal-L) bzw. 212% (BD-L) höher sind im Vergleich zum unbehandelten Liquid. Die Abbildung 32 verdeutlicht diese Unterschiede graphisch. Die ermittelten Werte weisen alle signifikante Unterschiede ( $p \geq 0,001$ ) auf.

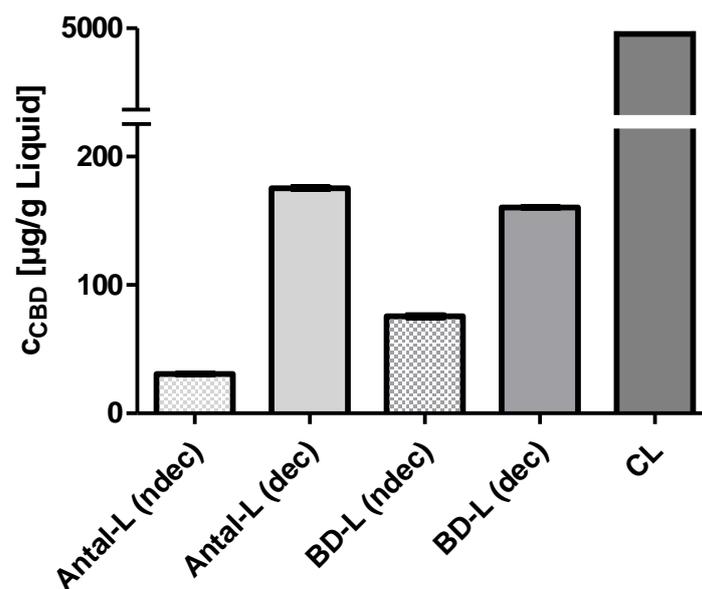


Abbildung 32: Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung der CBD-haltigen Liquids hergestellt aus pflanzlichem Material (Antal-L und BD-L) bzw. der reinen Substanz (CL) – Chromatographische Bestimmung der CBD-Konzentration im Liquid in µg/g; Antal-L = Rohdroge Antal zum Liquid verarbeitet, BD-L = Rohdroge Blue Dream zum Liquid verarbeitet, CL = 0,5% Cannabidiol-Liquid, dec = decarboxyliert, ndec = nicht decarboxyliert; Mittelwert ± Standardabweichung, ANOVA-Bonferroni: Konzentrationen unterscheiden sich signifikant auf dem 0,1% Niveau, (n = 3)

Die Abbildung 33A stellt die verdampfte Masse an Cannabidiol pro Zug in  $\mu\text{g}$  der untersuchten CBD-Liquids dar. Hier ist ein deutlicher Unterschied im Vergleich zum annähernd linearen Freisetzungverhalten der Leitsubstanzen der ätherischen Öle in den Liquids zu erkennen. Die verdampfte CBD-Masse weist kein lineares Verdampfungsverhalten zur Konzentration im Liquid auf. Entgegen der hoch signifikanten Unterschiede der CBD-Konzentrationen der Liquids bestehen keine signifikanten Abweichungen der verdampften Massen von Cannabidiol.

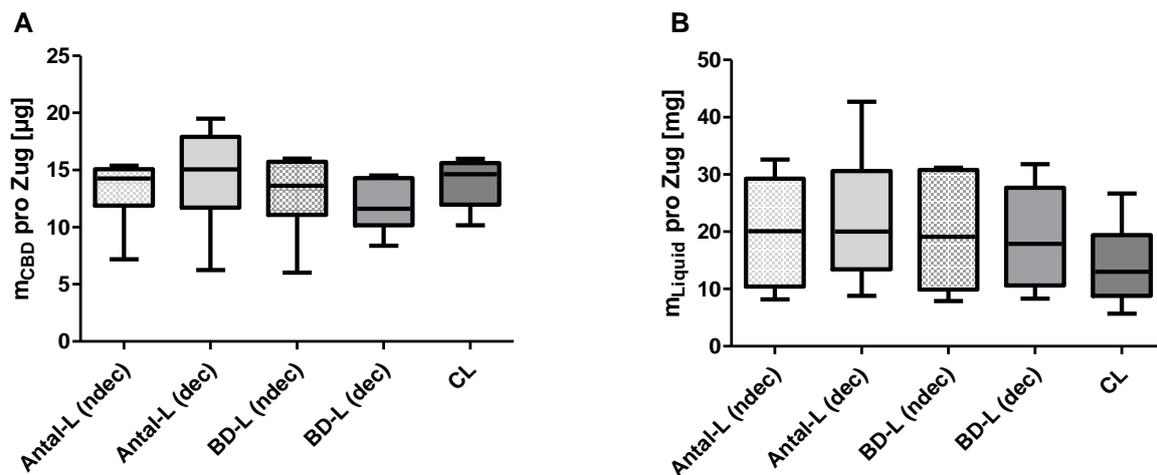


Abbildung 33: Ergebnisse der chromatographischen Untersuchung (A) und Massenbestimmung (B) der CBD-haltigen Liquids hergestellt aus pflanzlichem Material (Antal-L und BD-L) bzw. der reinen Substanz (CL) – A = Chromatographische Bestimmung der verdampften Masse von Cannabidiol (CBD) pro Zug in  $\mu\text{g}$ , B = Bestimmung der verdampften Masse der Liquids pro Zug in mg; Antal-L = Rohdroge Antal zum Liquid verarbeitet, BD-L = Rohdroge Blue Dream zum Liquid verarbeitet, CL = 0,5% Cannabidiol-Liquid, dec = decarboxyliert, ndec = nicht decarboxyliert; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, CBD-Konzentrationen unterscheiden sich nicht signifikant auf dem 5% Niveau; (n = 9)

Es ist auszuschließen, dass das Lösungsmittel in der Probenahme-Konstruktion während der Verdampfung gesättigt war. Während der Validierung wurde in einer Voruntersuchung eine Löslichkeit von mindestens 50 mg/mL Cannabidiol in 2-Propanol ermittelt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Cannabidiol eine bestimmte Freisetzungsrate pro Zug hat, da die Verdampfung der fünf cannabidiolhaltigen Liquids unabhängig von der Konzentration im Liquid ist. Diese Beobachtung ist bezogen auf die gewählten Parameter insbesondere auf die eingesetzte e-Zigarette und kann nicht auf andere technologische Umsetzungen übertragen werden. Eine vorherige Decarboxylierung des pflanzlichen Materials vor Verarbeitung zu einem Liquid scheint keinen signifikanten Einfluss auf die verdampfte Masse des Cannabidiols zu haben. Die Leistung der e-Zigarette ist ausreichend, um die Cannabidiolsäure während der Anwendung zu decarboxylieren. Die verdampfte Masse des unbehandelten im Vergleich zum decarboxylierten Antal-L beträgt  $13,2 \pm 2,5 \mu\text{g}$  (ndec)

bzw.  $14,5 \pm 3,9 \mu\text{g}$  (dec) CBD. Das BD-L weist vergleichbare Werte in Höhe von  $12,9 \pm 3,1 \mu\text{g}$  (ndec) und  $12,1 \pm 2,1 \mu\text{g}$  (dec) CBD auf, wohingegen das CL mit dem höchsten Gehalt an Cannabidiol  $13,9 \pm 2,1 \mu\text{g}$  pro Zug freisetzt. Die Leistung der e-Zigarette ist bereits bei 20 Watt in der Lage eine ausreichende Decarboxylierung durchzuführen. Auch die Ergebnisse der Abbildung 33B zeigen keine signifikanten Unterschiede auf dem 5% Niveau. Hierbei handelt es sich um die verdampfte Gesamtmasse der Liquids pro Zug in mg. Anders als in den Untersuchungen der ätherischen Öle ist die verdampfte Masse unabhängig von der Wirkstoffkonzentration.

Zur Untersuchung der Verdampfung bei Variation der Leistung der e-Zigarette wurde das Cannabidiol-Liquid (CL) ausgesucht. Die Abbildung 34A stellt die chromatographisch ermittelten Massen des Cannabidiols in  $\mu\text{g}$  pro Zug dar, wohingegen B die ermittelten Gesamtmassen des Liquids in mg pro Zug zeigt.

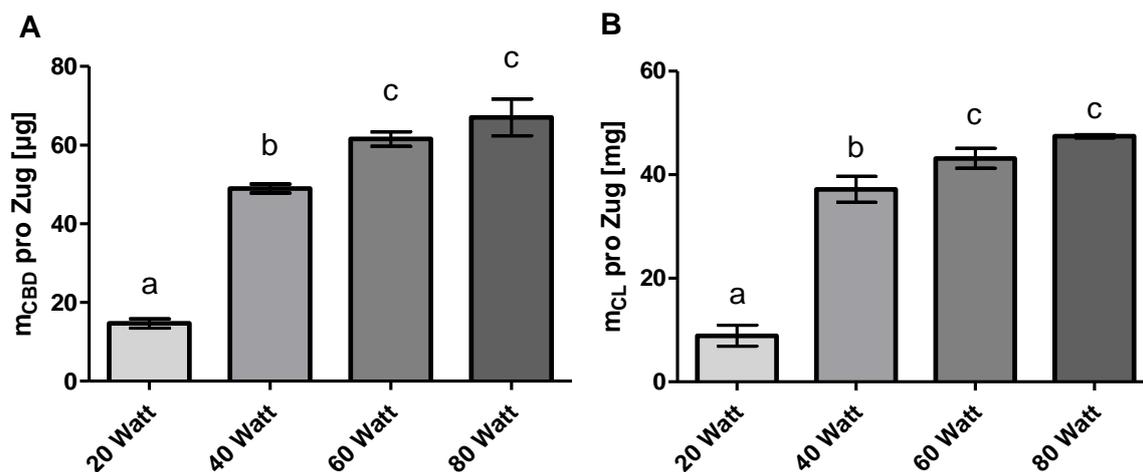


Abbildung 34: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Leistung der e-Zigarette auf das Verdampfungsverhalten des Cannabidiol-Liquids (CL) – A = Chromatographische Bestimmung der verdampften Masse von Cannabidiol pro Zug in  $\mu\text{g}$ ; B = Massenbestimmung des Cannabidiol-Liquids (CL) pro Zug in mg; CL = 0,5% Cannabidiol-Liquid; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Kennbuchstaben (a,b,c) unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau ( $n = 3$ )

Beide Säulendiagramme zeigen eine Zunahme der verdampften Masse bei Erhöhung der Leistung der e-Zigarette. Eine Zunahme der durchschnittlichen Verdampfungsrate des Liquids durch Erhöhung der Leistung der Heizspule konnte ebenfalls in der Publikation von Wu *et al.* durch die Messung der Aerosoldichte ermittelt werden (183). Eine lineare Zunahme der verdampften Masse eines nicotinhaltigen Liquids in einem Leistungsbereich der e-Zigarette zwischen 5 und 50 Watt wurde auch in einer Studie von Soulet *et al.* ermittelt (180). Die Kennbuchstaben (a, b, c) über den Säulen

unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau, daraus resultiert, dass die ermittelten Werte bei einer Leistung von 60 bzw. 80 Watt sich nicht signifikant unterscheiden. Die Freisetzungen von Cannabidiol wurden bei  $14,7 \pm 1,0 \mu\text{g}$  (20 Watt),  $49,0 \pm 0,9 \mu\text{g}$  (40 Watt),  $61,6 \pm 15,0 \mu\text{g}$  (60 Watt) und  $67,0 \pm 38,0 \mu\text{g}$  (80 Watt) pro Zug ermittelt. Die Massendifferenz des gesamten verdampften Liquids pro Zug betrug bei 20 Watt  $8,9 \pm 1,7 \text{ mg}$ , bei 40 Watt  $37,2 \pm 2,0 \text{ mg}$ , bei 60 Watt  $43,1 \pm 1,6 \text{ mg}$  und bei 80 Watt  $47,4 \pm 0,2 \text{ mg}$ . Der Grund für diese abnehmenden Unterschiede ist das Erreichen einer maximalen Freisetzungsrates. Die Leistung wird so hoch, dass die Bauteile nicht mehr ausgelegt sind auf eine Erhöhung der Verdampfung bzw. eine Temperaturzunahme. Die zwei verwendeten Verdampferköpfe sind über die Bereiche 20 – 60 Watt und 55 – 70 Watt definiert und nicht für die 80 Watt Leistung bauteilspezifisch entwickelt. Die erhöhte Leistungsanforderung kann keine steigende Leistung und somit keine Erhöhung der Freisetzungsrates liefern.

Abschließend wurde der Einfluss der Anzahl der Züge auf Änderungen in den Freisetzungsrates bei 20 Watt untersucht. Die Anzahl der Züge wurde nach dem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 20) generiert, jedoch zusammenhängend ohne Unterbrechungen zwischen den Zyklen. Die folgende Abbildung 35A stellt demnach die Masse an Cannabidiol pro Zug in  $\mu\text{g}$  dar, wohingegen B die bestimmte Gesamtmasse des verdampften Liquids abbildet.

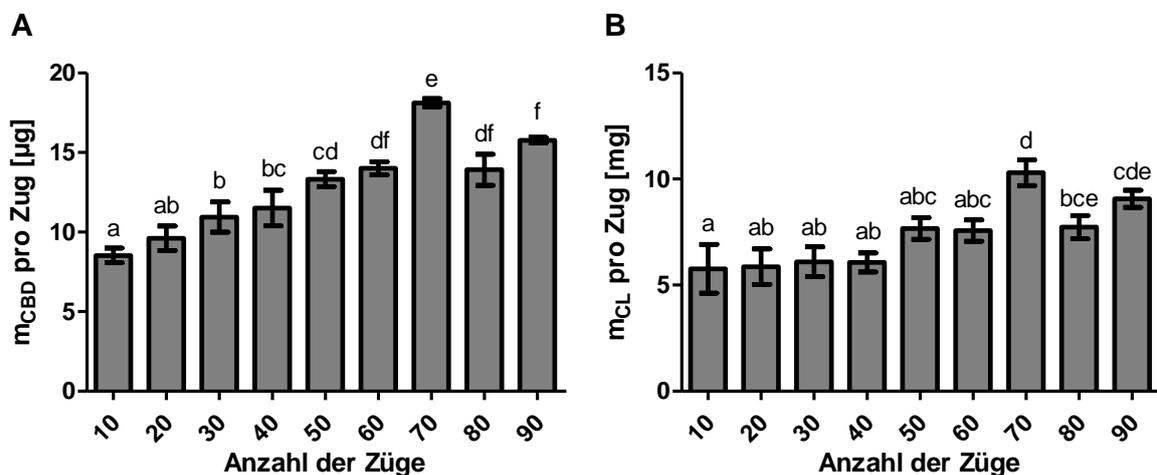


Abbildung 35: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Anzahl der Züge auf das Verdampfungsverhalten des Cannabidiol-Liquids (CL) bei 20 Watt– A = Chromatographische Bestimmung der verdampften Masse von Cannabidiol pro Zug in  $\mu\text{g}$ ; B = Massenbestimmung des Cannabidiol-Liquids (CL) pro Zug in mg; CL = 0,5% Cannabidiol-Liquid; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; Kennbuchstaben (a - f) unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau ( $n = 3$ )

Die Kennbuchstaben (a - f) über den Säulen unterscheiden sich signifikant auf dem 5% Niveau, daraus resultiert, dass Säulen mit den gleichen Buchstaben sich nicht signifikant unterscheiden. Die Diagramme zeigen beide ähnliche Tendenzen. Die Freisetzungsratescheint bis zu einer Anzahl von 40 Zügen nahezu gleichmäßig zu sein. Jedoch steigt die durchschnittliche Freisetzungsrates des CBD mit steigender Anzahl der Züge, aber auch die Masse des verdampften Liquids. Das Maximum der freigesetzten Masse mit signifikant unterschiedlichen Werten im Vergleich zu allen anderen ermittelten Werten ist bei 70 Zügen erreicht. Die kontinuierliche Wärmeentwicklung der Technologie, die das Liquid im Tank ebenfalls erwärmt, kann ein Grund für die erhöhte Freisetzungsrates sein. Die zusätzliche Erwärmung bewirkt einen kontinuierlichen Anstieg des freigesetzten Cannabidiols, jedoch keinen signifikanten Unterscheid zu der verdampften Masse an Liquid bis zu einer Anzahl an 70 Zügen. Bei einer höheren Anzahl an Zügen sinken die Massen so weit, dass sich die verdampften Massen von CBD nach 50, 60 und 80 Zügen bzw. 60, 80 und 90 Zügen nicht signifikant unterscheiden. Die steigende Wärmeentwicklung der e-Zigarette führt zu einer vermehrten Bildung von Kondenswasser, welches sich in den Schläuchen visuell niederschlägt und an den direkten Verbindungsstellen eine Kondensatrückführung in den Tank verursacht. Der sinkende Pegel der Tankfüllung und die gleichzeitige Vermischung mit dem Kondensat verringert die Wirkstoffkonzentration im Liquid und somit die verdampfte Masse. Das feuchte Aerosol kondensiert weiter an Kondensstropfen, was ebenfalls Substanzverluste im Dampf bewirken kann. Der Gebrauch als Medizinprodukt setzt nun pharmazeutische Kriterien voraus. Da jedoch die Technologie der e-Zigarette als Inhalator im Europäischen Arzneibuch nicht definiert ist, sind analoge Prüfungen für Inhalatoren erforderlich. In den Monographien des Europäischen Arzneibuches zu Darreichungsformen sind die Zubereitungen zur Inhalation definiert. Diese enthalten die bereits beschriebenen inhalativen Darreichungsformen (siehe 2.1.2 Technologien zur Inhalation von Substanzen) und ihre Prüfungen. Die Applikation, die der Technologie der e-Zigarette ähnelt, ist die Zubereitung zur Vernebelung, die definitionsgemäß durch unter hohem Druck stehende Gase, Ultraschallvibration oder Extrusion durch ein Siebnetz oder andere Methoden erzeugte Aerosole sind (125). Die Zubereitungen müssen die Prüfungen auf Gleichförmigkeit des Gehaltes bzw. der Masse bestehen und deren Akzeptanzkriterien erfüllen. Eine Abweichung von maximal 10% bzw. 15% vom Mittelwert der freigesetzten Wirkstoffkonzentration ist Vorgabe einer bestandenen Prüfung. Diese Akzeptanzkriterien konnte die e-Zigarette in den quantitativen Untersuchungen nicht erfüllen, somit besteht sie die Qualitätsanforderungen eines pharmazeutischen Applikationssystems nicht. Allerdings muss die Beurteilung der abgegebenen Dosis von anderen Vernebelungsvorrichtungen abweichen, da die meisten Vernebler eine kontinuierliche Aerosolbildung nach Einschalten des Gerätes aufweisen und somit die Gesamtmenge des abgegebenen Wirkstoffs betrachtet wird. Die tatsächliche Konzentration, die die Lunge des Anwenders erreicht, liegt jedoch sehr viel niedriger (siehe 2.1.2 Technologien zur Inhalation von Substanzen), da

der Verlust sehr groß ist. Die Technologie der e-Zigarette ermöglicht jedoch eine atemzuggesteuerte Applikation, die anders bewertet werden muss. Das Aerosol wird ungeachtet der Partikelgröße vollständig eingeatmet. So wird zwar die Technologie des Verneblers über die Gleichförmigkeit der freigesetzten Gesamtmasse nach Europäischem Arzneibuch bewertet, jedoch aber nicht seine medizinische Anwendung. Die Probenahme-Konstruktion (Abbildung 20) wurde allerdings konzipiert, um ein physiologisch angeglichenes Verfahren zu standardisieren. Die Anwendung ist demnach ebenfalls ein Kriterium der Untersuchung. Die strenge Einhaltung des Verdampfungsprotokolls ist kritisch zu betrachten, denn die Probenahme erfolgte in Zyklen (10 Züge). Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten auch, dass jeder Zug weitere Schwankungsbreiten aufweist, die stark temperaturabhängig sind. In der Monographie zu Darreichungsformen „Zubereitungen zur Inhalation“ werden die Dosierinhalatoren anhand von Sprühstößen quantifiziert (125). Diese Sprühstöße werden allerdings nicht näher definiert. Eine Standardisierung der zeitlichen Länge bzw. Krafteinwirkung zur Erzeugung eines Sprühstoßes erfolgt somit nicht und bietet eine gewisse Freiheit für Interpretationen. Außerdem werden explizit zugelassene Ausnahmen für alle drei Arten von Inhalatoren erwähnt, die abweichende Spezifikationen zu den angegebenen Abweichungen von  $\pm 15\%$  vom Mittelwert der abgegebenen Dosis tolerieren. Zudem müssen die pharmazeutischen Prüfungen ebenfalls auf die vergleichende Testung der Tanks bzw. e-Zigaretten des gleichen Modells ausgeweitet werden. Hier werden weitere Geräteabweichungen angenommen, die jedoch bei Inhalatormodellen der Vernebler ebenfalls zu vermuten sind. Es konnten nur wenige Publikationen gefunden werden, die eine Gleichförmigkeit der abgegebenen Masse am Beispiel des Nicotins bei e-Zigaretten untersuchten. In einer Publikation von Lee *et al.* wurde die Nicotin-Konzentration im Aerosol bei Variation der Spannung der e-Zigarette ermittelt. Dabei konnte  $34 \mu\text{g}$  (7,2 W),  $41 \mu\text{g}$  (10,0 W) und  $50 \mu\text{g}$  (14,4 W) Nicotin pro Zug mit Abweichungen zwischen  $\pm 60\%$  und  $\pm 85\%$  vom Mittelwert nachgewiesen werden (184). Farsalinos *et al.* ermittelten geringere Abweichungen vom Mittelwert der verdampften Nicotin-Konzentration ( $38 - 68 \mu\text{g}/\text{Zug}$ ) mit etwa  $\pm 9\%$  bis  $\pm 13\%$ , allerdings waren diese Ergebnisse stark abhängig vom Verdampfungsprotokoll. Es wird darauf hingewiesen, dass ein standardisiertes Protokoll für die Quantifizierung von Aerosolen aus e-Zigaretten dringend notwendig ist (185). In weiteren Publikationen können unabhängig vom Verdampfungsprotokoll die verdampften Nicotin-Konzentrationen ( $21 - 62 \mu\text{g}/\text{Zug}$ ) bestätigt werden (186). Es finden sich keine Angaben in den Gebrauchsanweisungen der e-Zigaretten zur Prüfen der Aerosolerzeugung. Die Gleichförmigkeit wird als schwer möglich bewertet aufgrund der Erwärmung der Bauteile. Diese Temperaturzunahme war so deutlich, dass eine Handhabung unter realen Bedingungen bei nicht streng definiertem Gebrauch schwierig sein könnte. Das muss entsprechend im Gebrauch angepasst und in der Gebrauchsanweisung angegeben werden. Da die Lippen des Anwenders beim Gebrauch der e-Zigarette sehr nah am Tank ansetzen, besteht hier bei vermehrten Zügen hintereinander

Verbrennungsgefahr bei hoher Leistung. Hierbei müsste auf sichere Modelle zurückgegriffen oder eine spezielle Vorrichtung konzipiert werden. Die Ergebnisse in den Untersuchungen zur Variation zur Leistung der e-Zigarette zeigen eine Korrelation zwischen analytisch quantifizierter Masse am Beispiel von CBD und 1,8-Cineol und steigender Leistung der e-Zigarette. Wie in Kapitel 4.2.1.1 Technologie der elektronischen Zigarette (e-Zigarette) beschrieben, werden Verdampferköpfe für bestimmte Leistungsbereiche definiert. Bei dieser Untersuchung musste der Verdampferkopf getauscht werden, so dass die Bereiche 20 - 60 Watt und 55 - 70 Watt, aber nicht 80 Watt abgedeckt waren. Der naheliegende Grund für die hohe Standardabweichung bei 80 Watt ist demnach eine mögliche Überlastung des zweiten Verdampferkopfes (55 - 70 Watt). Aufgrund der geschlossenen Öffnung der Belüftung könnte die starke Erwärmung auch durch einen Hitzestau verursacht worden sein. Allerdings würde die Veränderung dieser Einstellung bewirken, dass die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander nicht mehr gegeben ist. Deswegen und weil das standardisierte Verdampfungsprotokoll nach ISO-Norm ISO/TR 19478-2:2015 beibehalten werden sollte, wurde auf die Veränderung der Belüftung verzichtet. Die Variation zu vieler Parameter hätte eine gesonderte Betrachtung zur Folge. Die Voruntersuchungen zur Optimierung der Probenahme-Apparatur konnten zeigen, dass die durch das 2-Propanol geleiteten Dämpfe in der Feuchtefalle keine Leitsubstanzen der ätherischen Öle bzw. CBD mehr enthielten (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieses wurde geprüft, indem zwei bzw. drei Probenahme-Waschflaschen hintereinander verbunden wurden. Es konnten keine Konzentrationen oberhalb der Nachweisgrenze in der zweiten und folgenden Waschflaschen ermittelt werden.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass ein Medizinprodukt dieser Art eine definierte Leistung mit einem ebenfalls definierten Verdampferkopf aufweisen muss. Ebenso sollte die Einstellung der Belüftung auf eine bestimmte Anwendung optimiert und nicht variierbar sein. Diese Elemente dürfen nicht manipulierbar produziert werden. Prinzipiell konnte allerdings nachgewiesen werden, dass e-Zigaretten auf dem Qualitätsniveau des Europäischen Arzneibuches anderer Inhalatoren zur medizinischen Anwendung verwendet und dass die Regularien individuell ausgelegt werden können. Das fiktive Medizinprodukt sollte demnach aus zwei Bauteilen bestehen. Zum einen kann eine wieder aufladbare Energiequelle mit Universalgewinde zum mehrfachen Gebrauch hersteller-unspezifisch produziert werden. Zum anderen kann eine Einheit hersteller- und wirkstoffspezifisch hergestellt werden, die auf dieses Bauteil passgenau ist. In dieser Einheit kann das medizinische Liquid bestehend aus Träger und Wirkstoff in einen Tank mit konstanten, nicht variablen Parametern patientenindividuell produziert werden. Durch vorherige Validierungen können die gewünschten Dosierungen individuell hergestellt und appliziert werden. Für eine Zulassung des Liquids zum Arzneimittel zur Applikation mithilfe einer e-Zigarette sind allerdings noch umfangreiche klinische und toxikologische Studien notwendig.

## 5.2 Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymsystemen *in vitro*

Zur Untersuchung der Wechselwirkungen von Liquids bzw. Aerosolen gegenüber ausgewählten Enzymsystemen wurden Aktivitätsänderungen der Enzyme anhand von zwei Enzymaktivitäts-Assays mit drei biologischen Suspensionen ermittelt. Menschlicher Speichel besteht zu 99,5% aus Wasser und wird täglich je nach Stimulation zu 0,5 – 1,5 Liter produziert. Die wichtigsten weiteren Bestandteile sind die Mucine (Glycoproteine), Schleimstoffe, die das Schlucken der Nahrung ermöglichen, und das Enzym  $\alpha$ -Amylase, welches an der Spaltung komplexer Kohlenhydrate (Stärke) in der Mundhöhle beteiligt ist. Im Dünndarm kann eine weitere Spaltung von Kohlenhydraten bzw. Polysacchariden aufgrund der aus dem Pankreas sezernierten  $\alpha$ -Amylase erfolgen (18). Ebenso finden sich im Intestinalsaft pankreatische Proteasen, die Proteine und Polypeptide hydrolytisch spalten. Diese Enzyme haben zahlreiche komplexere biologische Funktionen als die Verdauung. So sind sie Schlüsselfaktoren für die Lebensfähigkeit und Gesundheit von Zellen in den meisten physiologischen Prozessen. Proteasen werden auch vom Epithel der Atemwege ausgeschieden und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der respiratorischen Homöostase (187). Chronische Atemwegserkrankungen wie die Mucoviszidose und COPD gehen mit einer Dysregulierung der Produktion von Enzymen und Mucinen einher. Aber auch der Konsum von nicotinhaltigen Aerosolen aus e-Zigaretten wird mittlerweile mit der Erhöhung der Gesamtproteolyse in der Lunge in Verbindung gebracht (188). So enthält der Speichel von Nutzern von e-Zigaretten im Vergleich zu Nicht-Anwendern niedrigere Konzentrationen an Immunglobulin A und Lysozym während die Konzentrationen an Lactoferrin erhöht sind (189). Eine Aktivitätsänderung von Enzymen im Mundraum kann somit Auswirkungen auf die Mundgesundheit haben. Die Polysaccharide in den Mucinen haben eine Barrierefunktion gegenüber enzymatischem Abbau, somit kann die Aktivitätsänderung von Enzymen korrelieren mit der Zu- oder Abnahme von Mucinen und der Beeinträchtigung des mukoziliären Transportsystems. Die Erhöhung der Enzymaktivitäten könnte demnach zu einem enzymatischen Abbau von Mucin führen, was wiederum die Abwehrmechanismen gegenüber bakteriellen Infektionen herabsetzen könnte (190). Es ist bekannt, dass die Konzentration an Mucinen mit dem Risiko für orale Infektionen korreliert (191).

Die Untersuchungen wurden mit den Liquids im flüssigen Zustand durch direkte Inkubation und auch nach Bedampfen der Probe als Aerosol durchgeführt. Bei direkter Behandlung der biologischen Suspensionen synthetischer Speichel (AHS), humaner Speichel (HS) und modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAIF) orientierten sich die eingesetzten Konzentrationen (0,05; 0,1 und 0,25 g/mL) an der jeweils mittleren bestimmten Masse an Liquid nach Bedampfen unter den verschiedenen angewandten Verdampfungsprotokollen, wie in Tabelle 20 dargestellt. In den analogen Aerosol-Untersuchungen wurde je 1 mL der jeweiligen biologischen Suspension in der Waschflasche der Probenahme-Konstruktion vorgelegt. Die Variationen der Verdampfungsprotokolle bestanden in der Leistung der e-Zigarette (Watt), der Anzahl der Züge und der Probenentnahmezeit nach dem Bedampfen. Die Erhöhung der Leistung der e-Zigarette und der Anzahl der Züge führt zu einer Steigerung der Hitzebildung und somit zu extremen Randbedingungen, die Enzyme denaturieren könnten. Vor und nach jeder Probenbehandlung wurde der Fluss überprüft bzw. nachjustiert.

**Tabelle 20: Verdampfungsprotokolle zur Variation der Parameter der Erzeugung von Aerosolen** – dargestellt sind die variablen Parameter: Leistung der e-Zigarette, Anzahl der Züge und Inkubation in Waschflasche nach Bedampfen. Die mittlere Verdampfungs­masse wurde nach jeder Untersuchung bestimmt. Konstante Parameter nach standardisiertem Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) – Zugdauer: 2 Sekunden, Flussrate Pumpe: 1,5 L/min, Intervall: 30 Sekunden, Volumen biologische Suspension in Waschflasche: 1 mL

<b>Verdampfungsprotokoll</b>	<b>VP1a</b>	<b>VP1b</b>	<b>VP2a</b>	<b>VP2b</b>	<b>VP3a</b>	<b>VP3b</b>
<b>Leistung e-Zigarette [Watt]</b>	20	20	20	20	80	80
<b>Anzahl der Züge</b>	10	10	30	30	10	10
<b>Inkubation in Waschflasche nach Bedampfen [min]</b>	0	10	0	10	0	10
<b>Mittlere Verdampfungs­masse [g]</b>	0,05	0,05	0,1	0,1	0,25	0,25

### 5.2.1 Direkte Inkubation

In der Abbildung 36 sind die Ergebnisse der beiden Enzymaktivitäts-Assays nach direkter Inkubation mit dem Basisliquid (B) und den drei Liquids mit dem jeweiligen ätherischen Öl (EL, ML, NL) dargestellt. Die Graphik zeigt die Veränderung der Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%), wobei zum einen das Enzym  $\alpha$ -Amylase anhand der drei biologischen Suspensionen AHS, HS und mAIF (A) und zum anderen das Enzym Protease anhand des modifizierten, synthetischen Intestinalsafte (B) untersucht wurde.

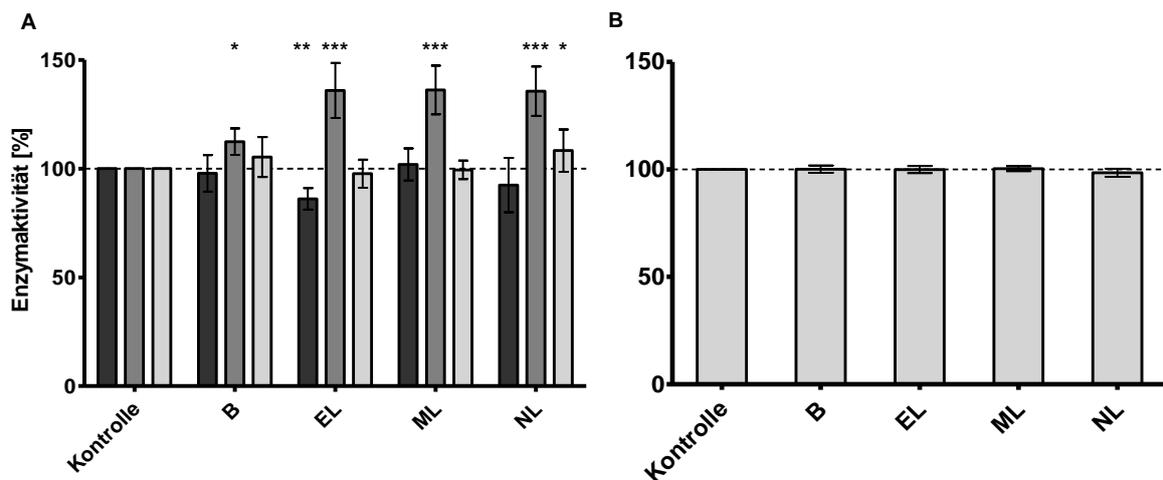


Abbildung 36: Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach direkter Inkubation – dargestellt ist die jeweilige Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%); ■ = synthetischer Speichel (AHS), ■ = humaner Speichel (HS), ■ = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAIF), B = Basisliquid, EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Dunnett \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle (100%), (n = 9)

Bei direkter Behandlung der biologischen Suspensionen AHS, mAIF und HS mit unterschiedlichen Konzentrationen der Liquids (0,05; 0,1 und 0,25 g/mL) konnten einzelne Veränderungen der Enzymaktivitäten der  $\alpha$ -Amylase beobachtet werden. Eine signifikante Aktivitätsabnahme ( $p \geq 0,01$ ) konnte bei der Behandlung des synthetischen Speichels mit Eucalyptusöl-Liquid (EL) ermittelt werden. In einigen untersuchten Inkubationsansätzen konnte ein Anstieg der Enzymaktivität um mehr als 30% beobachtet werden. Dies trifft hauptsächlich auf die Behandlung des humanen Speichels (HS) zu. Die Aktivität bei Inkubation mit Basisliquid (B) ist dabei signifikant gestiegen ( $p \geq 0,05$ ), wohingegen die Liquids mit ätherischem Öl (EL, ML, NL) alle einen hoch signifikanten Anstieg ( $p \geq 0,001$ ) der Enzymaktivität im humanen Speichel verursachten. Mögliche Gründe für diese erhöhte Aktivität könnten eine eventuell verbesserte Substratbindung oder Substratinteraktion zum Enzym sein. Eine weitere Möglichkeit wäre eine effektivere Konformation des Enzymmoleküls.

## 5.2.2 Aerosol-Untersuchungen

In den analogen Untersuchungen der Aerosole wurden sechs unterschiedliche Verdampfungsprotokolle (VP) verwendet, um die Veränderungen der Enzymaktivitäten durch Variation der technischen Parameter zu dokumentieren. In der Abbildung 37 sind die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Assays nach Bedampfen mit Basisliquid dargestellt.

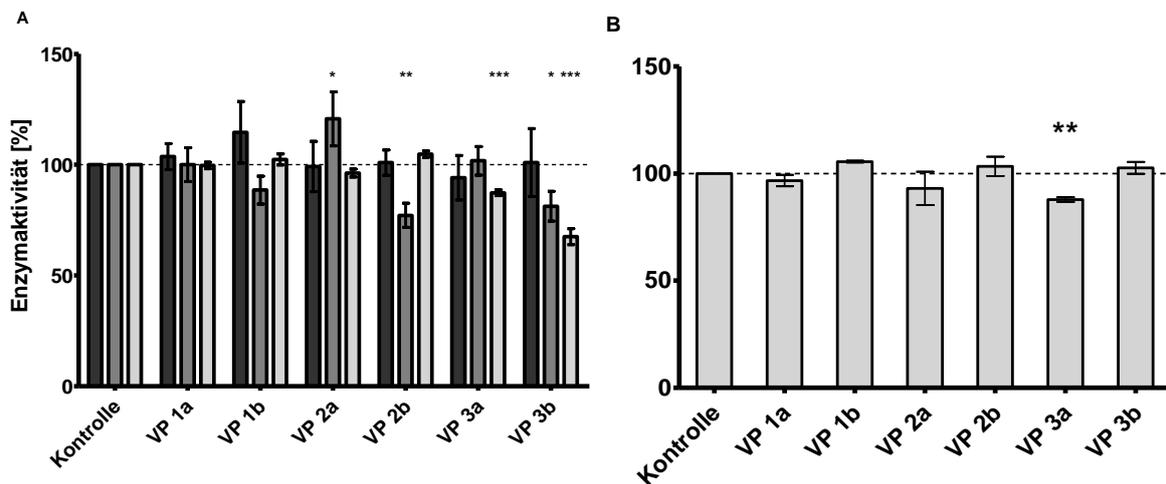


Abbildung 37: Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Basisliquid (B) – dargestellt ist die jeweilige Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%); ■ = synthetischer Speichel (AHS), ■ = humaner Speichel (HS), ■ = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAlF), VP = Verdampfungsprotokoll (Tabelle 20); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Dunnnett \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle (100%), ( $n = 3$ )

Das Bedampfen des synthetischen Speichels führte zu keiner signifikanten Änderung der Enzymaktivität. Lediglich das Verdampfungsprotokoll 1b mit einer Leistung der elektronischen Zigarette von 20 Watt bei 10 Zügen und einer 10-minütigen Wartezeit nach Bedampfen steigerte die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase sichtbar, jedoch nicht signifikant auf  $114,6\% \pm 11,3$ . Der humane Speichel wies hingegen höhere Aktivitätsschwankungen im Vergleich zur Kontrolle auf. Die Verdampfungsprotokolle mit einer 10-minütigen Inkubationszeit vor der Probenahme hatten jeweils signifikante Aktivitätsabnahmen der Amylase (VP 1b:  $88,6\% \pm 4,5$ ; VP 2b:  $77,1\% \pm 4,5$ ; VP 3b:  $81,2\% \pm 5,5$ ), wohingegen eine direkte Analyse zu einer unveränderten Aktivität führte. Die Ausnahme bildet das VP 2a mit einer signifikanten Aktivitätssteigerung ( $p \geq 0,05$ ) auf  $120,7\% \pm 10,0$ . Das Bedampfen des modifizierten, synthetischen Intestinalsaftes hatte nur in den Verdampfungsprotokollen mit einer Leistung der e-Zigarette von 80 Watt eine hoch signifikante Aktivitätsminderung von Amylase in Höhe von  $87,3\% \pm 1,0$  (VP 3a) und  $67,5\% \pm 2,9$  (VP 3b). Die Protease-Aktivität wies bei direkter Probenahme einen sinkenden Trend auf, der bei VP 3a sogar sehr signifikant ( $p \geq 0,01$ ) im Vergleich zur Kontrolle war.

Die Abbildung 38 stellt die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Assays nach Bedampfen mit Eucalyptusöl-Liquid dar. Auch hier konnten vereinzelt signifikante Aktivitätsminderungen ermittelt werden. Wohingegen die Amylase-Aktivität in den biologischen Suspensionen HS und mAIF eher gesteigert wurde. Die Aktivitätssteigerung in den Verdampfungsprotokollen mit direkter Behandlung (VP 1a, VP 2a, VP 3a) war signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Das Bedampfen des synthetischen Speichels führte wiederum zu einer nicht signifikanten Aktivitätssenkung.

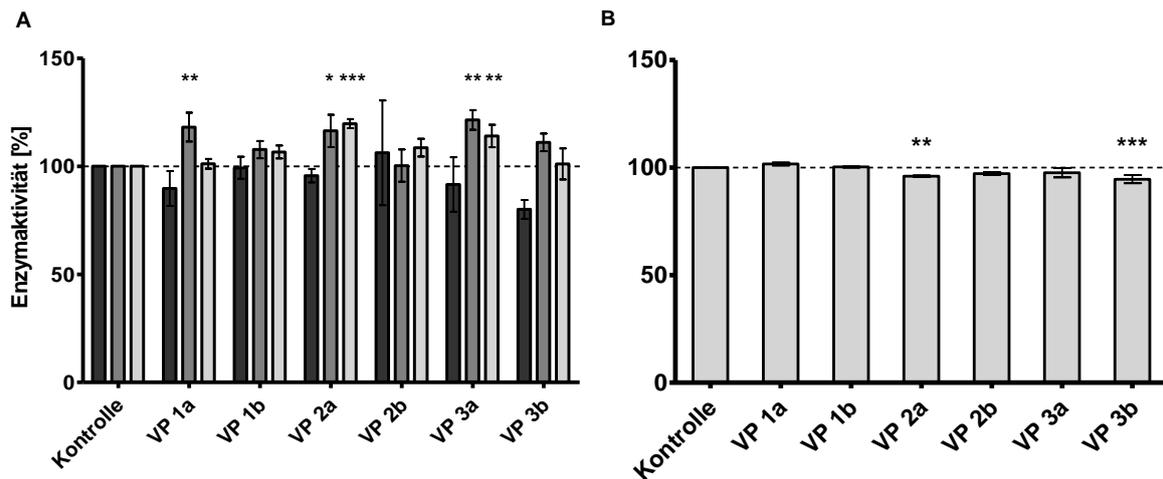


Abbildung 38: Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Eucalyptusöl-Liquid (EL) – dargestellt ist die jeweilige Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%); ■ = synthetischer Speichel (AHS), ■ = humaner Speichel (HS), ■ = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAIF), VP = Verdampfungsprotokoll (Tabelle 20); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Dunnett \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle (100%), (n = 3)

Die Änderungen der Enzymaktivitäten durch Behandlung mit ätherischen Ölen wurden bereits in anderen Untersuchungen beobachtet. In einer Studie von Capetti *et al.* konnte eine Inhibition von  $\alpha$ -Amylase nach einem modifizierten Amylase-Assay nach Bernfeld von  $34\% \pm 3$  (*Eucalyptus globulus* L.) und  $39\% \pm 6$  (*Mentha arvensis* L.) durch 1%ige wässrige Lösungen erreicht werden (192). Die inhibierende Wirkung von Inhaltsstoffen aus Eucalyptusarten auf  $\alpha$ -Amylase konnte mehrfach bestätigt werden (193, 194). Diese inhibierenden Konzentrationen können jedoch durch das verhältnismäßig kurze Bedampfen nicht erreicht werden und wirken sich in diesen Untersuchungen dagegen nicht aus. Die Ergebnisse aus der direkten Inkubation (Abbildung 36) stehen dem eher gegensätzlich gegenüber, da eine Aktivitätssteigerung ermittelt werden konnte. Hier müssen weitere Faktoren betrachtet werden, da die untersuchte Modellsubstanz das Basisliquid als Träger hat und somit sich dieser Einfluss ebenfalls auf die Enzyme auswirken kann.

Weiterhin wurde der Einfluss des Minzöl-Liquids gegenüber der Enzymaktivität untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 39 graphisch dargestellt. Während bei niedriger Verdampfungsleistung (20 Watt) das Bedampfen von AHS und mAIF mit ML weder zur Inaktivierung der Protease noch zum Herabsetzen der Amylase-Aktivität führten, wurde beim Bedampfen von humanem Speichel (HS) auch bei niedriger Leistung (VP 1a) eine Senkung der Enzymaktivität um  $16,9\% \pm 1,3$  beobachtet. Bei äquivalentem Bedampfen des HS mit einer folgenden Inkubation von 10 min (VP1b) konnte dieses Ergebnis jedoch nicht bestätigt werden. Hier lag die Amylase-Aktivität nach Bedampfen bei  $101,7\% \pm 2,4$ . Ähnlich verhielt sich die Amylase-Aktivität nach Bedampfen von HS bei erhöhter Anzahl der Züge (VP 2a -  $91,7\% \pm 7,5$  bzw. VP 2b -  $119,1\% \pm 2,0$ ). Diese nicht signifikanten Unterschiede lassen vermuten, dass zunächst eine akute Konformationsänderung der Amylase erreicht wird, jedoch durch weiteres Einwirken und Wechselwirken zwischen Enzym und Inhaltsstoffen im Aerosol nach 10-minütiger Inkubation vor der Messung diese Inaktivierung möglicherweise aufgehoben wird. Die Amylase-Aktivität im modifizierten, synthetischen Intestinalsaft steigt minimal in den Behandlungen mit 10-minütiger Wartezeit vor der Probenahme (VP 1b:  $103,1\% \pm 7,0$ ; VP 2b:  $109,0\% \pm 4,2$ ; VP 3b:  $109,4\% \pm 2,3$ ) und sinkt bei direkter Analyse (VP 1a:  $84,8\% \pm 7,4$ ; VP 2a:  $91,6\% \pm 1,0$ ; VP 3a:  $87,9\% \pm 3,4$ ), allerdings nur bei VP 1a signifikant. Dagegen wurde die Protease-Aktivität im bedampften mAIF bei einer Leistung von 80 Watt um  $10,9\% \pm 1,1$  (VP 3a;  $p \geq 0,01$ ) bzw.  $22,5\% \pm 4,0$  (VP 3b;  $p \geq 0,001$ ) signifikant gesenkt.

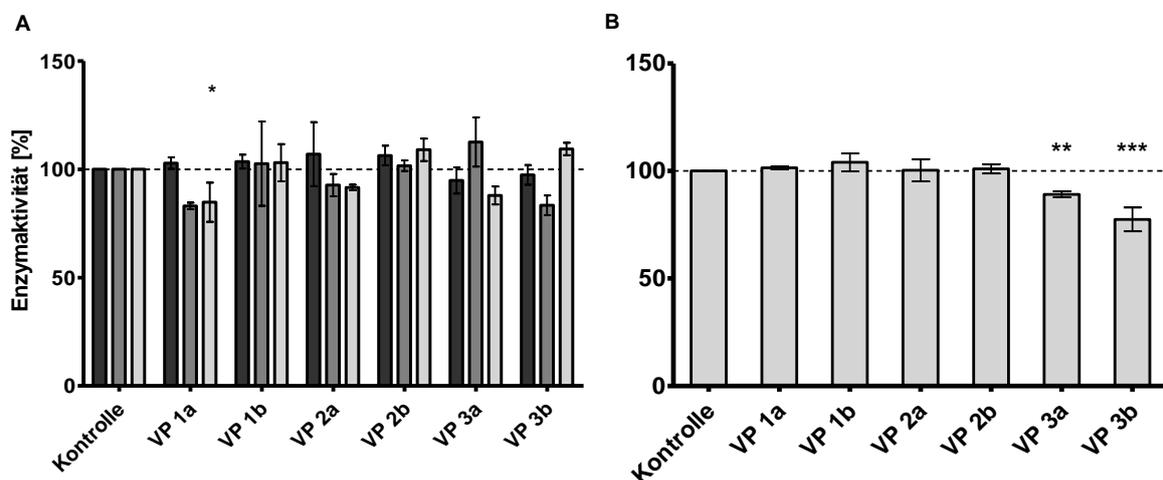


Abbildung 39: Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Minzöl-Liquid (ML) – dargestellt ist die jeweilige Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%); ■ = synthetischer Speichel (AHS), ■ = humaner Speichel (HS), ■ = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAIF), VP = Verdampfungsprotokoll (Tabelle 20); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Dunnett \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle (100%), (n = 3)

Die Aktivitätsänderung des Enzyms Protease konnte auch bei hoher Leistung nach Bedampfen von mAIF mit Nelkenöl-Liquid (Abbildung 40) nicht beobachtet werden. Hier blieb die Aktivität konstant mit Ausnahme des Verdampfungsprotokolls VP 1b. Die Amylase-Aktivität im synthetischen Speichel (AHS) und Intestinalsaft (mAIF) blieb ebenfalls überwiegend unverändert. Währenddessen zeigte die Aktivität der  $\alpha$ -Amylase in den gleichen Ansätzen des humanen Speichels herabgesetzte Wirkungen in allen Untersuchungsprotokollen. Jedoch waren diese aufgrund der großen Standardabweichungen nur bei VP 2b ( $58,0\% \pm 15,1$ ) signifikant. Nichtsdestotrotz waren diese Abnahmen die höchsten, die in den Enzymaktivitäts-Assays dokumentiert wurden. Eine Ursache könnte in der inhomogenen Beschaffenheit der humanen Speichelproben liegen. Die Hemmung von pankreatischer  $\alpha$ -Amylase durch Nelkenöl bzw. Inhaltsstoffen aus der Gewürznelke wurde bereits in Publikationen dokumentiert. So konnte ein wässriges bzw. ethanolisches Mazerat aus gemahlene Gewürznelken die Aktivität um 52,8% bzw. 10,5% anhand Amylase-Assays nach Bernfeld inhibieren. Es wird vermutet, dass diese Hemmung auf phenolische Verbindungen zurückzuführen ist, die im Nelkenöl zu mindestens 70% in Form der Hauptkomponente Eugenol vorkommen (194–196). Alle genannten Studien beziehen sich auf eine potenzielle hypoglykämische Aktivität von pflanzlichen Inhaltsstoffen.

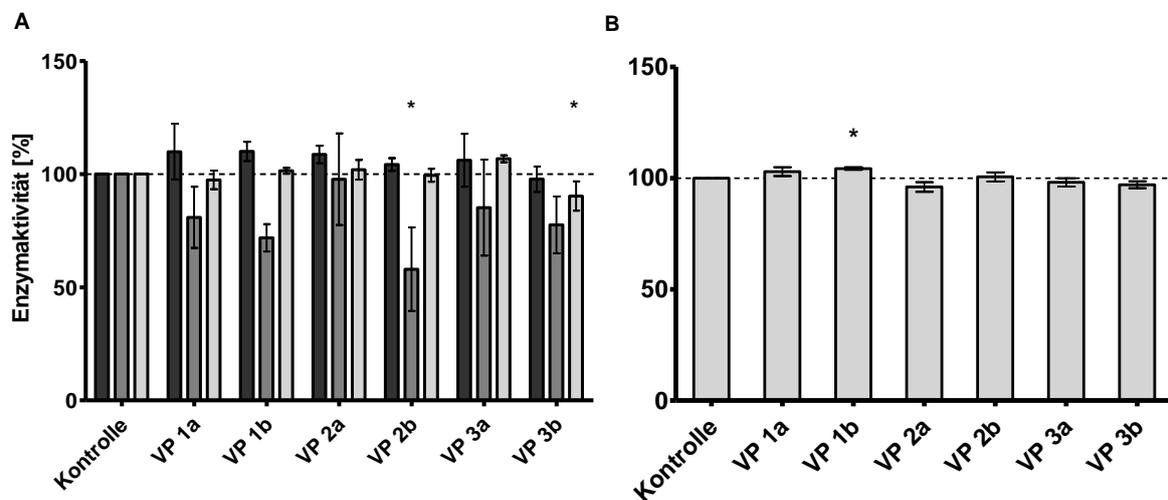


Abbildung 40: Ergebnisse der Wechselwirkungen anhand des Amylase-Assays (A) und Protease-Assays (B) nach Bedampfen mit Nelkenöl-Liquid (NL) – dargestellt ist die jeweilige Enzymaktivität im Vergleich zur Kontrolle (100%); ■ = synthetischer Speichel (AHS), ■ = humaner Speichel (HS), ■ = modifizierter, synthetischer Intestinalsaft (mAIF), VP = Verdampfungsprotokoll (Tabelle 20); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung; ANOVA-Dunnett \*  $p \leq 0,05$ ; \*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$  im Vergleich zur Kontrolle (100%), ( $n = 3$ )

Abschließend können folgende wichtige Aussagen zu den Ergebnissen dieser Untersuchungen getroffen werden. Die direkte Behandlung mit den untersuchten Liquids hat eher eine steigernde als eine hemmende Wirkung auf die untersuchten Enzymaktivitäten. Dies ist auf ein mögliches

Wechselwirken zwischen den Inhaltsstoffen und den Enzymen zurückzuführen. In den Aerosol-Untersuchungen wurde bei niedriger Leistung von 20 Watt eine unveränderte bzw. leichte Änderung der Enzymaktivitäten gemessen. Dabei hat eine anschließende Inkubation der bedampften, biologischen Suspensionen für einen Zeitraum von 10 Minuten einen eher hemmenden bzw. im Fall von Minzöl eher einen steigernden Effekt. Das Bedampfen mit Nelkenöl-Liquid führte zu den größten Aktivitätsminderungen dieser Untersuchungsreihe. Eine hohe Leistung beim Verdampfen wurde tendenziell mit einer Hemmung der Enzymaktivitäten assoziiert. Welche der verdampften Substanzen für diese Hemmung verantwortlich sind und welche Mechanismen dieser Hemmung zugrunde liegen, konnte im Rahmen der Untersuchungen nicht abschließend geklärt werden. In einzelnen Publikationen werden zwar Terpenoide für Aktivitätsänderungen genannt, jedoch ohne Aufklärung der Mechanismen. Zudem kann mit dieser Untersuchung nicht festgestellt werden, ob es beim Bedampfen zu möglichen anderen Reaktionen kommt, die die Vergleichbarkeit mit der direkten Inkubation stört. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse ist das Verdampfen der untersuchten Liquids unter milden Bedingungen empfehlenswert. Eine Erhöhung der Anzahl der Züge ist denkbar, da diese nicht zu signifikanten Einschränkungen in Enzymaktivitäten, insbesondere der oral relevanten  $\alpha$ -Amylase geführt haben. Bei einer literaturbasierten Betrachtung des Basisliquid als mögliches Vehikel zur Applikation von Wirkstoffen ist besonders darauf zu achten, dass das untersuchte Liquid nicotin- und aromenfrei ist. Viele Studien zielen auf einen Vergleich zwischen e-Zigaretten und Tabakzigaretten bzw. auf einen Vergleich der Wirkung bei Variation der Nicotin-Konzentration ab (197). Diese Studien wurden nur berücksichtigt, wenn das Basisliquid als Kontrollsubstanz diente. Eine Publikation von Ghosh *et al.* ermittelte einen drei- bis vierfachen Anstieg der Konzentration des Mucins 5AC nach Bedampfen von menschlichen Epithelkulturen der Atemwege und Epithelien aus Mäusenasen *in vivo* mit einem nicotinfreien Aerosol aus Basisliquid (198). Die Überexpression von Mucin 5AC ist assoziiert mit Asthma und COPD. Obwohl diese Ergebnisse mehrfach bestätigt wurden (199–201), konnten Garcia-Arcos *et al.* nur einen nicotinabhängigen Zusammenhang ermitteln. Das nicotinfreie Aerosol beeinflusste Lungenparameter wie die Expression von Mucin und Proteasen nicht (202). Für einen potentiellen Einsatz einer Propylenglycol-Glycerin-Mischung als Vehikel für die Applikation von medizinischen Wirkstoffen müssen diese Substanzen weiterhin beobachtet werden. Abgesehen von einer medizinischen Inhalation mithilfe der e-Zigarette ist die Inhalation zu Genusszwecken weiterhin sehr verbreitet und bedarf weitestgehend keiner Regulierung. Diese beiden Substanzen werden allerdings bereits in zugelassenen inhalativen Arzneimitteln eingesetzt. Die unterschiedlichen rechtlichen Regelungen müssen in Zukunft einheitlich festgelegt werden.

## 5.3 Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro*

Um die antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole und deren Bestandteile analysieren zu können und einen potentiellen Einsatz als medizinische Anwendung zu untersuchen, wurden mikrobiologische Untersuchungen mit sechs Bakterienarten durchgeführt. In den direkten Methoden werden die antibakteriellen Eigenschaften der eingesetzten flüssigen Modellschubstanzen charakterisiert, wohingegen in den indirekten Methoden die Aerosole untersucht werden.

### 5.3.1 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Liquids (direkte Methoden)

#### 5.3.1.1 Agardiffusionstest

Bei der Agardiffusion wird die Inhibierung des Bakterienwachstums aufgrund eines radialen Konzentrationsgradienten einer diffundierenden Substanz durch Messung der Größe der Zone bestimmt, in der die Substanz das Bakterienwachstum vollständig hemmt. Die Masse der hier untersuchten Substanzen wurde auf 30 µg festgelegt. Zum Vergleich wurde das Antibiotikum Tobramycin und das Tobramycin-Liquid in gleicher Konzentration untersucht. Die Bakterien wurden je nach Empfindlichkeit gegenüber der Modellschubstanz in einem bestimmten Radius am Wachstum gehindert. Die folgende Tabelle 21 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.

**Tabelle 21: Ergebnisse der Untersuchung der Inhibierungszone mithilfe von Agardiffusion mit 30 µg der Modellschubstanzen für sechs Bakterienarten nach (169)** – dargestellt sind die Durchmesser der Hemmhöfe inhibierender Modellschubstanzen in mm; *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), L = Liquid, CBD = Cannabidiol, vl = vollständige Inhibierung, - = keine Inhibierung bei 30 µg; Mittelwerte der Durchmesser Ø [mm] (n = 3)

Modellschubstanz (30 µg)	Hemmhof [Ø mm]					
	P.a. 289	K.p. 245	MRSA 29	S.p. 351	M.c. 358	H.i. 361
<b>Basisliquid</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Propylenglycol</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Eucalyptusöl</b>	-	10,0	11,0	17,0	vl	vl
<b>Minzöl</b>	-	9,0	31,7	23,0	vl	vl
<b>Nelkenöl</b>	-	11,0	18,3	vl	37,3	31,3
<b>Tobramycin</b>	-	12,7	-	-	29,0	23,7
<b>Eucalyptusöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Minzöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Nelkenöl-L</b>	-	-	-	46,0	14,0	-
<b>CBD-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tobramycin-L</b>	-	24,3	15,0	18,0	36,7	32,3

Das Basisliquid, das Propylenglycol und die hergestellten Liquids Eucalyptusöl-L, Minzöl-L und CBD-L zeigten keine inhibierende Wirkung gegenüber den sechs eingesetzten Bakterienarten. Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* konnte von keiner Substanz in der angegebenen Konzentration gehemmt werden. Dies ist darin begründet, dass es sich um ein multiresistentes Bakterium handelt, das gegen antibakterielle Wirkungen eine besondere Toleranz zeigt. In einer Studie von Woolfery *et al.* konnte allerdings ein multiresistentes *P. aeruginosa* (ATCC 27853) Isolat mit vergleichbarem Resistenzmuster durch 10 µg Tobramycin mit der Agardiffusion gehemmt werden. Der Hemmhof-Durchmesser lag bei 16 – 19 mm (203). Dies stimmt auch mit den Werten der EUCAST ( $\varnothing = 18$  mm) überein (204). Dasselbe Isolat ATCC 27853 konnte in einer anderen Publikation durch ein zusatzfreies Basisliquid gehemmt werden und wies einen pH-Wert-unabhängigen Hemmhofdurchmesser von 17 – 18 mm auf (205). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass sich die Bakterien innerhalb ihrer Spezies stark unterscheiden können und sie immer in Bezug auf das untersuchte Isolat zu deuten sind. Das Bakterium *Klebsiella pneumoniae* konnte von den drei reinen ätherischen Ölen in den eingesetzten Konzentrationen inhibiert werden. Hier lagen die Hemmhöfe in vergleichbaren Durchmessern (Eucalyptusöl: 10,0 mm, Minzöl: 9,0 mm und Nelkenöl: 11,0 mm) vor. Auch beim Antibiotikum Tobramycin und dem dazugehörigen Liquid fand eine Hemmung statt, jedoch weist die Behandlung mit Liquid interessanterweise einen größeren Durchmesser auf als die Inkubation mit der Reinsubstanz. Dabei ist die Konzentration von Tobramycin im Liquid nur 1%ig und das Basisliquid weist selbst keine Hemmung auf. Dieses Ergebnis konnte bei allen übrigen Bakterienarten beobachtet werden. Die Gram-negativen Bakterien *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* zeigten größere Inhibierungszonen bei Behandlung mit Tobramycin-Liquid (K.p.: 24,3 mm, M.c.: 36,7 mm und H.i.: 32,3 mm) verglichen mit dem reinen Tobramycin (K.p.: 12,7 mm, M.c.: 29,0 mm und H.i.: 23,7 mm) auf. Die Gram-positiven Bakterien MRSA und *Streptococcus pneumoniae* wurden dagegen nicht durch Tobramycin inhibiert bei gleichzeitiger Hemmung durch das Liquid (MRSA: 15,0 mm und S.p.: 18,0 mm). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass es einen Unterschied in den Diffusionseigenschaften zwischen dem reinen Tobramycin und seinem Liquid im Agar gibt. Es ist jedoch ebenfalls möglich, dass das Liquid eine Erhöhung der Wirkung des Tobramycins aufgrund bisher nicht untersuchter Mechanismen, wie Wechselwirkungen mit Calciumionen, die die Tobramycin-Resistenz erhöhen, verursacht (206). Das Tobramycin als Feststoff musste als einzige Modellsubstanz in Medium gelöst werden. Die entsprechende gelöste Konzentration wurde dann auf das Filterplättchen getropft. Alle anderen Modellsubstanzen liegen bei Raumtemperatur im flüssigen Zustand vor. Es könnte somit zur Diffusion des Antibiotikums in das Nährmedium gekommen sein. Im Vergleich zu den Liquids bzw. den ätherischen Ölen ist jedoch diese Anwendung standardisiert. Das Übertragen von standardisierten Methoden auf andere Modellsubstanzen muss demnach mit besonderer Vorsicht erfolgen. Sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Bakterien (Ausnahme:

*P. aeruginosa*) erwiesen sich *in vitro* als empfindlich gegenüber den drei reinen ätherischen Ölen Eucalyptusöl, Minzöl und Nelkenöl. Generell zeigten sich in diesen Empfindlichkeiten auch keine deutlichen Unterschiede, wenn multiresistente den vergleichsweise sensibleren Keimen gegenübergestellt wurden. Dabei kam es jedoch bei den zwei Gram-negativen Bakterienarten *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae* gegenüber Eucalyptusöl und Minzöl zu einer vollständigen Hemmung bei der eingesetzten Konzentration von 30 µg. *Moraxella catarrhalis* konnte sogar durch das Nelkenöl-Liquid mit einem Durchmesser von 14,0 mm inhibiert werden. Das Bakterium *Streptococcus pneumoniae* wurde ebenfalls durch das Nelkenöl-Liquid (46,0 mm) gehemmt bei gleichzeitiger vollständiger Inhibierung durch das reine Nelkenöl. Es wird allgemein vermutet, dass die äußere Phospholipidmembran der Gram-negativen Bakterien eine Barriere gegenüber lipophilen Verbindungen wie ätherischen Ölen darstellt. Gram-positive Bakterien dagegen verfügen über eine lipophile Zellwand, die für die ebenfalls lipophilen Komponenten der ätherischen Öle permeabel ist, indem entweder eine Erhöhung der Ionendurchlässigkeit oder der Austritt intrazellulärer Bestandteile bewirkt wird. Ebenfalls können sie bakterielle Enzymsysteme beeinträchtigen (207, 208). Trotzdem können ätherische Öle, wie auch diese Arbeit zeigt, antibakterielle Wirkungen auch gegen Gram-negative Bakterien entfalten. Genauere Analysen der einzelnen Bestandteile der ätherischen Öle könnten Aufschluss über die wirksamen Inhaltstoffe gegenüber Gram-negativen Bakterien geben, denn sie sind in der Lage, über die Porinproteine der äußeren Membran in das Periplasma einzudringen (209). Die qualitativen Ergebnisse der Agardiffusion sind immer bezogen auf eine bestimmte Konzentration der Modellsubstanzen (30 µg). Sie können zwar in Wirksamkeitsstufen eingeteilt werden, liefern allerdings keine belastbare Aussage über die quantitative minimale Hemmkonzentration (MHK). Außerdem können bakteriostatische oder bakterizide Effekte einer Modellsubstanz so nicht ermittelt werden, da Wachstumsinhibition nicht mit bakteriellem Zelltod gleichzusetzen ist. Nichtsdestotrotz ist die Agardiffusion ein allgemein gültiger Standard einer Screeningmethode, um prinzipiell *in vitro* antimikrobiell wirksame Substanzen zu ermitteln.

#### 5.3.1.2 Mikrodilution

Die standardisierte Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration erfolgte in dieser Arbeit mit dem Mikrodilutionsverfahren. Mithilfe geometrisch verdünnter Probelösungen wurden Hemmkonzentrationen photometrisch ermittelt. Dabei ist die niedrigste Konzentration, die die Vermehrung der Bakterien verhindert bzw. hemmt die minimale Hemmkonzentration (MHK).

Wie aus Tabelle 22 hervorgeht, wiesen alle Modellsubstanzen ein sehr breites Spektrum an antibakteriellen Aktivitäten sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterienarten mit MHK-Werten von  $12 \cdot 10^{-8}$  bis 512 g/L auf.

**Tabelle 22: Ergebnisse der Untersuchung der minimalen Hemmkonzentrationen der Modellsubstanzen mithilfe von Mikrodilution für sechs Bakterienarten nach (169)** – dargestellt sind die mithilfe von geometrisch verdünnten Modellsubstanzen ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen in g/L für sechs Bakterienarten; *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), L = Liquid, CBD = Cannabidiol (n = 7)

Modellsubstanz	MHK [g/L]					
	P.a. 289	K.p. 245	MRSA 29	S.p. 351	M.c. 358	H.i. 361
<b>Basisliquid</b>	128	128	256	128	64	64
<b>Propylenglycol</b>	64	128	128	32	32	64
<b>Eucalyptusöl</b>	64	128	32	16	0,5	2
<b>Minzöl</b>	512	128	32	4	32	2
<b>Nelkenöl</b>	128	16	16	1	1	0,5
<b>Tobramycin</b>	2	0,016	0,5	0,002	$12 \cdot 10^{-8}$	0,004
<b>Eucalyptusöl-L</b>	128	128	256	128	32	64
<b>Minzöl-L</b>	128	128	128	64	16	8
<b>Nelkenöl-L</b>	128	64	64	64	4	16
<b>CBD-L</b>	256	256	0,5	0,5	0,125	64
<b>Tobramycin-L</b>	128	2	32	2	0,008	4

Gegenüber den drei untersuchten multiresistenten Bakterienarten *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und MRSA zeigten die Modellsubstanzen eine geringere antibakterielle Aktivität als gegenüber den Bakterienarten *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis* und *Haemophilus influenzae*. Die stärkste hemmende Wirkung gegenüber allen untersuchten Bakterienarten hatte – wie bereits vermutet – das Antibiotikum Tobramycin. Es hat als Aminoglycosid-Antibiotikum ein sehr breites Wirkungsspektrum, was durch diese Ergebnisse bestätigt werden kann. Von den untersuchten Modellsubstanzen waren prinzipiell die reinen ätherischen Öle in ihrer antibakteriellen Wirkung meist überlegen. Das Basisliquid sowie dessen Bestandteil Propylenglycol zeigten eine sehr geringe antibakterielle Aktivität. Die folgende Abbildung 41 zeigt die logarithmische Darstellung der MHK-Werte der Modellsubstanzen für die sechs Bakterienarten geordnet nach Wirkungsstärke.

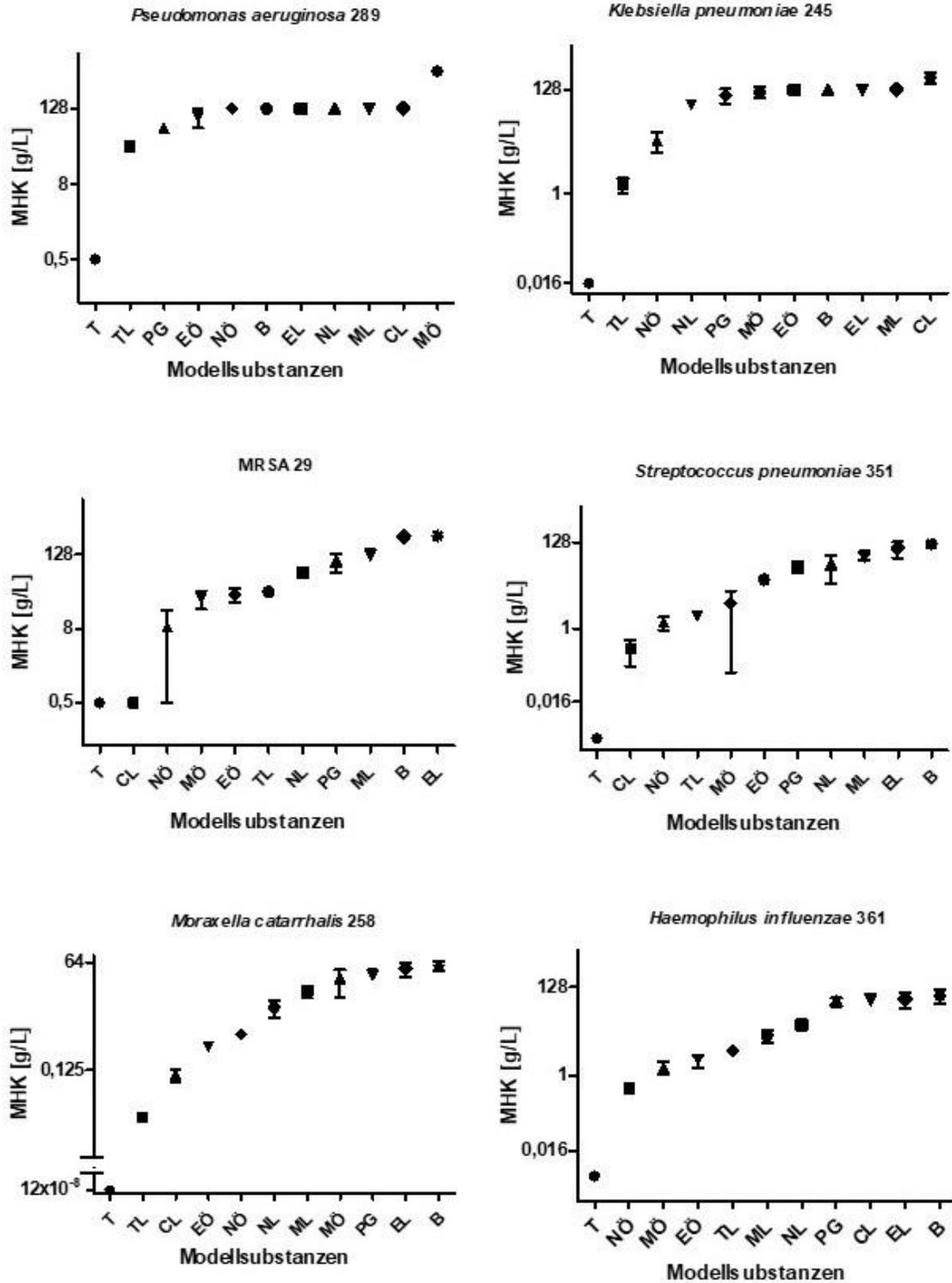


Abbildung 41: Logarithmische Darstellung der MHK-Werte der Modellsubstanzen mithilfe von Mikrodilution für sechs Bakterienarten nach (169) – dargestellt sind die logarithmischen MHK-Werte der Modellsubstanzen gegenüber sechs Bakterienarten in g/L aufsteigend geordnet nach der MHK: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, B = Basisliquid, PG = Propylenglycol, EÖ = Eucalyptusöl, MÖ = Minzöl, NÖ = Nelkenöl, T = Tobramycin, EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid, CL = Cannabidiol-Liquid, TL = Tobramycin-Liquid; MHK = minimale Hemmkonzentration; Mittelwert ± Standardabweichung (n = 7)

Die Modellsubstanzen zeigten gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* die geringste antibakterielle Aktivität. Hier liegen die minimalen Hemmkonzentrationen zwischen 64 g/L (PG und EÖ) und 512 g/L (MÖ) verglichen mit dem Antibiotikum Tobramycin mit 2 g/L. Vergleichbare Werte weisen die antibakteriellen Aktivitäten gegenüber *Klebsiella pneumoniae* auf. Die MHK des Tobramycins liegt hier bei 16 mg/L, dabei weist das Tobramycin-Liquid einen vergleichsweise hohen Wert von 2 g/L auf. Die anderen Hemmkonzentrationen wurden zwischen 16 g/L (NÖ) und 256 g/L (CL) ermittelt. Auch die minimalen Hemmkonzentrationen des MRSA-Isolates sind vergleichbar mit den Werten der beiden anderen multiresistenten Bakterien und liegen bei 16 g/L (NÖ) bis 256 g/L (B und EL). Allerdings weist hier das Cannabidiol-Liquid einen MHK-Wert von 0,5 g/L auf und ist damit vergleichbar mit der Wirkung des Antibiotikums. Die anderen Bakterienarten, die respiratorische Infektionen verursachen können und sensibler gegenüber Antibiotika sind, waren gegen alle Modellsubstanzen empfindlicher, was an den – im Vergleich zu den Antibiotika-resistenten Arten – geringeren minimalen Hemmkonzentrationen erkennbar war. Die ermittelten MHK-Werte des Bakteriums *Streptococcus pneumoniae* lagen zwischen 0,5 g/L (CL) und 128 g/L (B und EL). Die antibakterielle Wirkung von Cannabidiol gegenüber sensiblen und resistenten Gram-positiven Bakterien, wie MRSA und *Streptococcus pneumoniae* wird in einigen Studien beschrieben. So konnten bereits 1976 van Klingerden und ten Ham minimale Hemmkonzentrationen bei 1 – 5 mg/L an sensiblen Spezies von Staphylokokken und Streptokokken dokumentieren (210). Ähnliche Werte wurde für Isolate vom Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 u.a.) von Appendino *et al.* 2008 (0,5 -1 mg/L) und von Martinenghi *et. al* 2020 (1 mg/L) ermittelt, wobei die zweite Forschungsgruppe einen Gram-negativen *Pseudomonas aeruginosa* (PA01) ebenfalls untersuchte und einen MHK-Wert von >64 mg/L für CBD publizierte, was ebenfalls vergleichbar ist mit den Ergebnissen in dieser Untersuchung (211, 212). Wassmann *et. al* ermittelten 2020 einen MHK-Wert von 4 mg/L für MRSA und stellten eine 64-fache Reduktion dieser minimalen Hemmkonzentration in Kombination mit dem Antibiotikum Bacitracin fest. Dieser synergistische Effekt konnte bei Gram-negativen Bakterien nicht festgestellt werden (213). Den Grund für diese Wirkung sehen alle Forschungsgruppen in der Veränderung der Morphologie der Zellenwände. CBD hat das Potential die Zellmembran zu permeabilisieren und als detergenzähnliches Mittel zu wirken. Die fehlende CBD-Aktivität gegen die meisten Gram-negativen Bakterien wird mit dem Vorhandensein der äußeren Membran und des Lipopolysaccharids zusammenhängen. In der aktuellen Studie von Blaskovich *et al.* von 2021 zum antibakteriellen Potential von Cannabidiol wurden viele Gram-positive und Gram-negative Bakterien untersucht. Dabei konnten die Ergebnisse der vorherigen Publikationen bestätigt werden. Die minimalen Hemmkonzentrationen für sensible und resistente Stämme von *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae* ergaben MHK-Werte von 1 – 4 mg/L. Ebenfalls konnten bei den Gram-negativen Bakterien *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) und *Haemophilus influenzae* (ATCC 49247) MHK-

Werte in Höhe von >64 mg/L ermittelt werden. Interessanterweise hat *Moraxella catarrhalis* (MMX 3782) in den Untersuchungen einen MHK-Wert von 1 mg/L (214). Diese Relationen konnten auch in den Untersuchungen dieser Arbeit bestätigt werden. Die antibakteriellen Aktivitäten der Modellschubstanzen gegenüber *Moraxella catarrhalis* befinden sich im Bereich zwischen 0,125 g/L (CL) und 64 g/L für das Basisliquid. Das Tobramycin erreicht für dieses Bakterium die geringste minimale Hemmkonzentration mit 12 µg/L wobei das 1%ige Tobramycin-Liquid einen MHK-Wert von 8 mg/L aufweist. Die MHK-Werte von *Haemophilus influenzae* liegen zwischen 0,5 g/L (NÖ) und 64 g/L (B, PG, EL und CL), wobei das Tobramycin einen Wert von 4 g/L und das zugehörige Liquid einen Wert von 0,004 g/L ausweist. Die bereits erwähnten Isolate für *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) konnten in einer Publikation von Fuochi *et al.* im Mikrodilutionsverfahren bei einer Konzentration von 12,5% (125 g/L) an zusatzfreiem Basisliquid vollständig abgetötet werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Werten aus Tabelle 22 (205). Es konnte interessanterweise für keine Bakterienart eine Korrelation zwischen dem MHK-Wert des Basisliquids und einer Reinsubstanz bezogen auf das 1%ige Liquid mit dieser Reinsubstanz gefunden werden. Das heißt, dass das Produkt aus den prozentualen Anteilen der Bestandteile nicht auf den MHK-Wert des Liquids schließen lässt. Selbst dann nicht, wenn man die Verdünnungsstufen ins Verhältnis setzt. Hier müssen andere Wirkmechanismen die Ursache sein. Eine Einteilung der Bakterienarten nach Gram-Färbung führt zu keiner allgemeingültigen Aussage. Die Interpretation dieser Ergebnisse in einem klinischen Kontext bedarf einen Überblick über die MHK-Grenzwerte der jeweiligen Bakterienarten. Der klinische Grenzwert entscheidet über die Resistenz oder Empfindlichkeit gegenüber einer antibakteriell wirkenden Substanz. Dies bedeutet auch, dass eine antimikrobielle Therapie keine Wirkung zeigen kann, wenn die im Labor ermittelten Hemmkonzentrationen am Wirkort nicht erreicht werden können (215). Hier zeigt sich der Vorteil einer topischen Applikation direkt am Wirkort im Vergleich zur systemischen Anwendung, bei der viel höhere Konzentrationen verabreicht werden müssen. Die Klassifikation entspricht demnach der Wahrscheinlichkeit zwischen Behandlungserfolg und Therapieversagen. Für diese Einteilungen ist u.a. das *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) verantwortlich, welches die antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung standardisiert und die Klassifikationen aktualisiert. Diese klinischen Werte liegen im Milligramm bzw. Mikrogramm pro Liter Bereich. Die meisten hier ermittelten Werte liegen weit außerhalb dieses Bereiches, somit haben die Modellschubstanzen eine eher geringe klinische Relevanz. Allerdings wurden vereinzelt Werte in diesem Konzentrationsbereich gemessen, wie beispielsweise bei *Moraxella catarrhalis* und den Modellschubstanzen Eucalyptusöl (MHK = 500 mg/L) und Cannabidiol-Liquid (MHK = 125 mg/L) oder *Haemophilus influenzae* und Nelkenöl (MHK = 500 mg/L).

**Tabelle 23: Vergleich der Ergebnisse der antibakteriellen Wirkung der Modellsubstanzen mithilfe von Agardiffusion (Inhibitionszone [mm], n = 3) und Mikrodilution (MHK [g/L], n = 7) gegenüber sechs Bakterienarten nach (169) – dargestellt ist der direkte Vergleich der Ergebnisse beider Methoden zur Bestimmung von antibakteriellen Parametern; *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), MS = Modellsubstanz, B = Basisliquid, PG = Propylenglycol, EÖ = Eucalyptusöl, MÖ = Minzöl, NÖ = Nelkenöl, T = Tobramycin, EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid, CL = Cannabidiol-Liquid, TL = Tobramycin-Liquid, MHK = minimale Hemmkonzentration: vi = vollständige Inhibierung, - = keine Inhibierung bei 30 µg; Ø = Durchmesser [mm]**

MS	P.a. 289			K.p. 245			MRSA 29			S.p. 351			M.c. 358			H.i. 361		
	Ø [mm]	MHK [g/L]	MHK [g/L]	Ø [mm]	MHK [g/L]	MHK [g/L]	Ø [mm]	MHK [g/L]	MHK [g/L]	Ø [mm]	MHK [g/L]	MHK [g/L]	Ø [mm]	MHK [g/L]	MHK [g/L]	Ø [mm]	MHK [g/L]	
B	-	128	128	-	128	256	-	128	128	-	128	64	-	64	64	-	64	
PG	-	64	128	-	128	128	-	128	32	-	32	32	-	32	64	-	64	
EÖ	-	64	128	10,0	128	32	11,0	32	16	17,0	16	0,5	vi	0,5	2	vi	2	
MÖ	-	512	128	9,0	128	32	31,7	32	4	23,0	4	32	vi	32	2	vi	2	
NÖ	-	128	16	11,0	16	16	18,3	16	1	vi	1	1	37,3	1	0,5	31,3	0,5	
T	-	2	0,016	12,7	0,016	0,5	-	0,5	0,002	-	0,002	12·10 <sup>-8</sup>	29,0	12·10 <sup>-8</sup>	0,004	23,7	0,004	
EL	-	128	128	-	128	256	-	256	128	-	128	32	-	32	64	-	64	
ML	-	128	128	-	128	128	-	128	64	-	64	16	-	16	8	-	8	
NL	-	128	64	-	64	64	-	64	64	46,0	64	4	14,0	4	16	-	16	
CL	-	256	256	-	256	0,5	-	0,5	0,5	-	0,5	0,125	-	0,125	64	-	64	
TL	-	128	2	24,3	2	32	15,0	32	2	18,0	2	0,008	36,7	0,008	4	32,3	4	

Ein Vergleich zwischen den Ergebnissen der qualitativen Agardiffusion und der quantitativen Mikrodilution ist in der Tabelle 23 dargestellt. Eine Aussage über die Korrelation von MHK-Werten zu den Inhibierungszonen kann nicht getroffen werden. Diese Behauptung müsste immer in Bezug auf die jeweilige Modellsubstanz in Verbindung mit der Bakterienspezies vermutlich sogar mit dem speziellen Isolat getroffen werden, da bereits in der Literatur beschrieben wird, dass die minimalen Hemmkonzentrationen derselben Spezies um 2 – 4  $\log_2$ -Stufen schwanken können (215). So verursacht beispielsweise Eucalyptusöl mit einer MHK von 128 g/L gegenüber *Klebsiella pneumoniae* einen sichtbaren Hemmhof ( $\varnothing = 10,0$  mm), jedoch tritt bei *Pseudomonas aeruginosa* dieser nicht auf, trotz geringerer minimaler Hemmkonzentration (EÖ: 64 g/L). Diese Beobachtung trifft sowohl auf die multiresistenten als auch die gegen Antibiotika sensibleren Bakterienarten zu und lässt sich keinen bestimmten Modellsubstanzen zuordnen. Diese Feststellung bezogen auf ätherische Öle wurde bereits publiziert. So konnte ermittelt werden, dass starke Wirkstoffe mit geringer Hydrophilie eine geringere antimikrobielle Aktivität in der Agardiffusion zeigten (122). Dies ist zurückzuführen auf zwei Faktoren: Zum einen sind ätherische Öle Vielstoffgemische, die aus sehr vielen Komponenten bestehen, die ihre Wirkung unterschiedlich stark ausprägen. Zum anderen hängt die Interpretation der Inhibierungszone nicht nur von ihrem Durchmesser ab. Weitere Variablen für jede einzelne Komponente der ätherischen Öle wie Diffusionskoeffizienten und Volatilität, aber auch für die verwendeten Materialien, wie Adsorption, Nährmedium und Volumen sind von Bedeutung (216). Da die hergestellten Liquids ebenfalls aus mehreren Komponenten bestehen, lassen sich diese Argumente auf alle Modellsubstanzen übertragen. Dies führt zu dem Schluss, dass eine unüberschaubare Anzahl an unbekanntem Parametern in die qualitative Untersuchungsmethode der Agardiffusion mit ihren größeren Fehlermöglichkeiten hineinfließen und die aussagekräftigere Primärmethode die Mikrodilution bleibt (215).

### 5.3.1.3 Time-Kill-Methode

Die Time-Kill-Methode diente zur Untersuchung der bakteriziden oder bakteriostatischen Aktivität einer bestimmten Konzentration einer Modells substanz gegenüber den Isolaten der sechs ausgewählten Bakterienarten im zeitlichen Verlauf. Sie ist demnach die Darstellung der Absterbekinetik. Die in diesen Untersuchungen ausgewählten Konzentrationen waren die einfache und die doppelte minimale Hemmkonzentration bestimmt über die Mikrodilutionsmethode. Kommt es bei diesen Konzentrationen zu einer vollständigen Abtötung der Bakterien, spricht man auch von der minimalen bakteriziden Konzentration (MBK). Die bakterizide Aktivität ist definiert als eine Abnahme der koloniebildenden Einheiten um 99,9% im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Als Positivkontrolle wurde stets Ethanol (70%) mitgeführt. Dies führte in allen Untersuchungen zum vollständigen Abtöten der Bakterien zum Zeitpunkt  $t_0$  der Probenahme. Alle Untersuchungsreihen wurden in zweifacher Ausführung ( $n = 2$ ) durchgeführt und die jeweiligen Versuchsergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Die logarithmische Darstellung der Time-Kill-Kurven erfolgt durch Auftragen von  $\log_{10}(\text{KBE/mL})$  gegen die Zeit.

Die Abbildung 42 zeigt die Ergebnisse der Time-Kill-Methode von *Pseudomonas aeruginosa* gegenüber allen eingesetzten Modells substanz. Das linke Diagramm zeigt die zeitliche Absterbekinetik der jeweiligen minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) und das rechte Diagramm zeigt die jeweilige doppelte minimale Hemmkonzentration (2MHK) der Modells substanz.

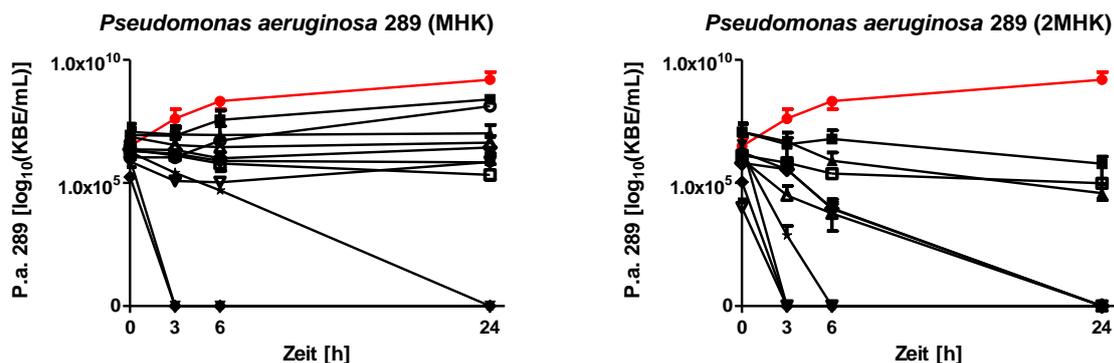


Abbildung 42: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modells substanz an *Pseudomonas aeruginosa* 289 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ - Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), △ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽ - Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ )

Die Hemmung des sichtbaren Bakterienwachstums ist bei allen Modellsubstanzen im Vergleich zur Negativkontrolle nach 24 Stunden gegeben. Eine minimale bakterizide Konzentration ist jedoch nur bei den minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) der Modellsubstanzen Eucalyptusöl (64 g/L), Nelkenöl (128 g/L) und dem CBD-Liquid (256 g/L) sowie bei den doppelten minimalen Hemmkonzentrationen (2MHK) von allen übrigen Liquids (EL, NL, ML und TL) bei 256 g/L erreicht. Somit sind für die erwähnten Substanzen die einfachen bzw. doppelten MHK-Werte mit den MBK-Werten gleichzusetzen. Interessanterweise konnte weder die einfache noch die doppelte minimale Hemmkonzentration des Minzöls und des Tobramycins in reiner Form die bakterizide Aktivität erreichen. Hier konnte nur die Anzahl der überlebenden Bakterien konstant für 24 Stunden gehemmt werden. Es muss demnach zu einer Wirkverstärkung zwischen der reinen Substanz und den Bestandteilen des Liquids gekommen sein.

Ein Vergleich mit den Ergebnissen (Abbildung 43) der Time-Kill-Methode von *Klebsiella pneumoniae* stellt ebenfalls eine bakterizide Aktivität der minimalen Hemmkonzentrationen der reinen ätherischen Öle bereits nach drei Stunden ( $t_1$ ) dar. Mit Ausnahme vom Tobramycin-Liquid zeigten auch hier die hergestellten Liquids und das Propylenglycol bei den doppelten minimalen Hemmkonzentrationen (EL: 256 g/L, NL: 128 g/L, ML: 256 g/L, CL: 512 g/L und PG: 256 g/L) ebenfalls die Fähigkeit bakterizid zu wirken.

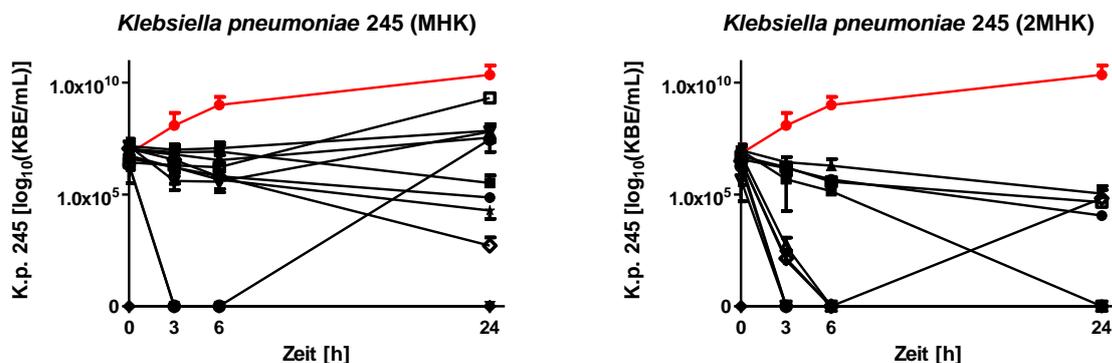


Abbildung 43: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an *Klebsiella pneumoniae* 245 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ - Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), △ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽ - Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert ± Standardabweichung (n = 2)

Die Behandlung mit Nelkenöl in der Konzentration 16 g/L konnte die Anzahl der überlebenden Bakterien bereits zum Zeitpunkt  $t_0$  der Probenahme bakterizid reduzieren. Dieses konnte ebenfalls an den Ergebnissen der Bakterienart MRSA beobachtet werden. Auch hier konnten keine koloniebildenden Einheiten nach Behandlung mit einer minimalen Hemmkonzentration von 16 g/L Nelkenöl ausgezählt werden (Abbildung 44). Mit Ausnahme der Modellsubstanzen Propylenglycol, Basisliquid und CBD-Liquid erreichten hier alle übrigen Testsubstanzen eine bakterizide Aktivität in ihren minimalen Hemmkonzentrationen. Die Behandlung mit Basisliquid konnte diese erst in der doppelten Hemmkonzentration erreichen. Interessanterweise kam es beim Propylenglycol und CBD-Liquid nach 24 Stunden wieder zu einem Anstieg der Bakterienkolonien.

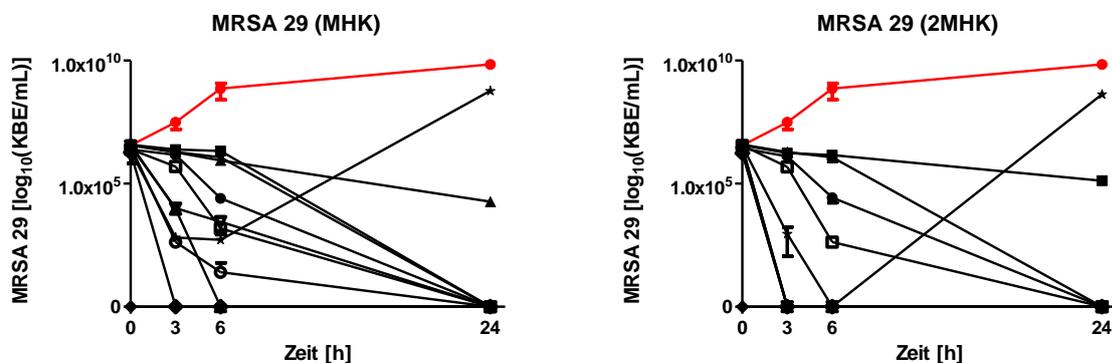


Abbildung 44: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an MRSA 29 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ – Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), △ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽- Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert ± Standardabweichung (n = 2)

Da die minimalen Hemmkonzentrationen der multiresistenten Bakterienarten zum Teil sehr viel höher waren verglichen mit den gegenüber Antibiotika sensibleren Bakterienarten müssen diese Ergebnisse immer in Zusammenhang mit den tatsächlichen Konzentrationen gesehen werden. Die Einteilung in einfache und doppelte MHK-Werte gibt nur die Relationen zu der Hemmung wieder und nicht eine potentielle klinische Bedeutung.

Die Ergebnisse der Time-Kill-Methode an *Streptococcus pneumoniae* sind in Abbildung 45 dargestellt. Hier zeigten sich ähnliche Verläufe der Absterbekinetik wie in Abbildung 44. Es konnte eine Übereinstimmung der minimalen Hemmkonzentration mit der minimalen bakteriziden Konzentration für die ätherischen Öle Eucalyptusöl (16 g/L), Minzöl (4 g/L), Nelkenöl (1 g/L) und die Liquids Eucalyptusöl-Liquid (128 g/L), Minzöl-Liquid (64 g/L), Nelkenöl-Liquid (64 g/L), CBD-Liquid (0,5 g/L) und Tobramycin-Liquid (2 g/L) bereits nach drei Stunden ( $t_1$ ) festgestellt werden. Dabei wurde eine vollständige Abtötung bereits zum Zeitpunkt  $t_0$  der Probenahme aufgrund von Nelkenöl (MHK) und dem Nelkenöl- und Eucalyptusöl-Liquid (2MHK) beobachtet. Eine bakterizide Aktivität von Propylenglycol und Tobramycin wurde im Vergleich zur Negativkontrolle in diesen Untersuchungen nicht erreicht.

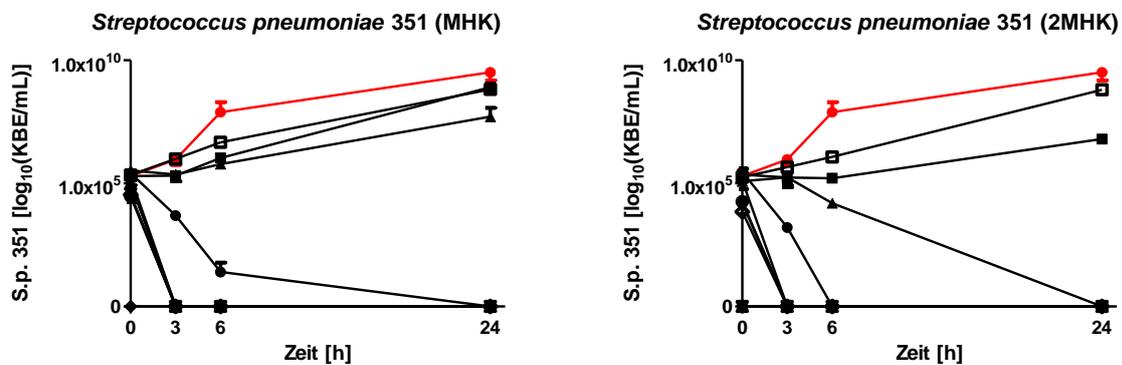


Abbildung 45: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellschubstanzen an *Streptococcus pneumoniae* 351 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ – Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), Δ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽ - Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n = 2)

Die Absterbekinetik von *Moraxella catarrhalis* gegenüber den Modellsubstanzen ist in Abbildung 46 dargestellt. Die Behandlung mit dem Tobramycin-Liquid in der Konzentration 8 mg/L (MHK) sowie den reinen ätherischen Ölen mit ihren MHK-Werten (EÖ: 0,5 g/L, MÖ: 32 g/L, NÖ: 1 g/L) konnte die Anzahl der überlebenden Bakterien zum Zeitpunkt  $t_1$  der Probenahme nach drei Stunden bakterizid reduzieren. Das Minzöl-Liquid (2MHK) in einer Konzentration von 32 g/L wirkte ebenfalls vollständig abtötend. Alle übrigen Modellsubstanzen wirkten in ihren einfachen und doppelten minimalen Hemmkonzentrationen bakteriostatisch auf die Anzahl der überlebenden Bakterien für 24 Stunden. Es konnte allerdings eine steigende Tendenz des Bakterienwachstums ermittelt werden.

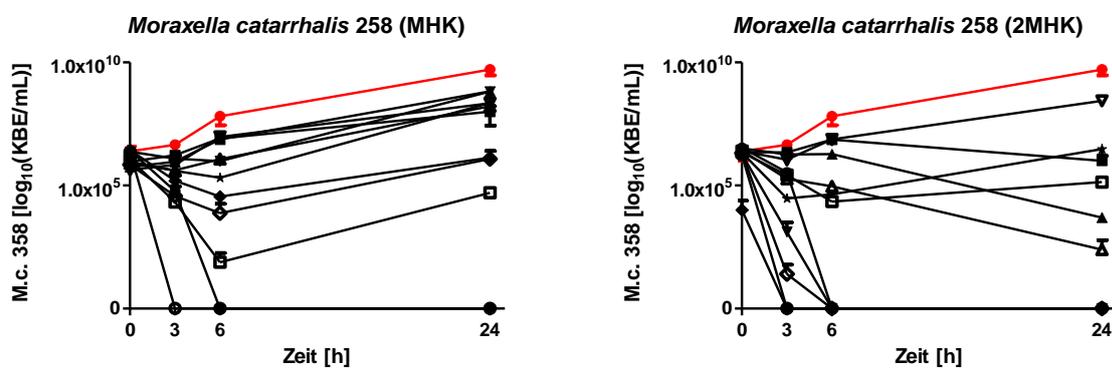


Abbildung 46: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an *Moraxella catarrhalis* 258 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ – Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), Δ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽- Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert ± Standardabweichung (n = 2)

Die Ergebnisse der bakteriostatischen und bakteriziden Wirkungen der Modellsubstanzen gegenüber *Haemophilus influenzae* sind in Abbildung 47 dargestellt. Auch hier konnte eine Übereinstimmung der minimalen Hemmkonzentration mit der minimalen bakteriziden Konzentration für die ätherischen Öle Eucalyptusöl (2 g/L), Minzöl (2 g/L), Nelkenöl (0,5 g/L), das Antibiotikum Tobramycin (4 mg/L) und die Liquids Eucalyptusöl-Liquid (64 g/L), CBD-Liquid (64 g/L) und Tobramycin-Liquid (4 g/L) nach maximal 6 Stunden ( $t_2$ ) festgestellt werden. Dabei wurde eine vollständige Abtötung des Bakteriums bereits zum Zeitpunkt  $t_0$  der Probenahme nach Behandlung mit Nelkenöl (2MHK) beobachtet. Auch die doppelten MHK-Werte von Propylenglycol und Basisliquid bewirkten eine Bakterizidie im zeitlichen Verlauf nach 24 Stunden ( $t_3$ ). Die bakterizide Aktivität von Minzöl-Liquid und Nelkenöl-Liquid wurde im Vergleich zur Negativkontrolle in diesen Untersuchungen nicht erreicht, jedoch konnte eine erhebliche Verringerung der Lebensfähigkeit ermittelt werden.

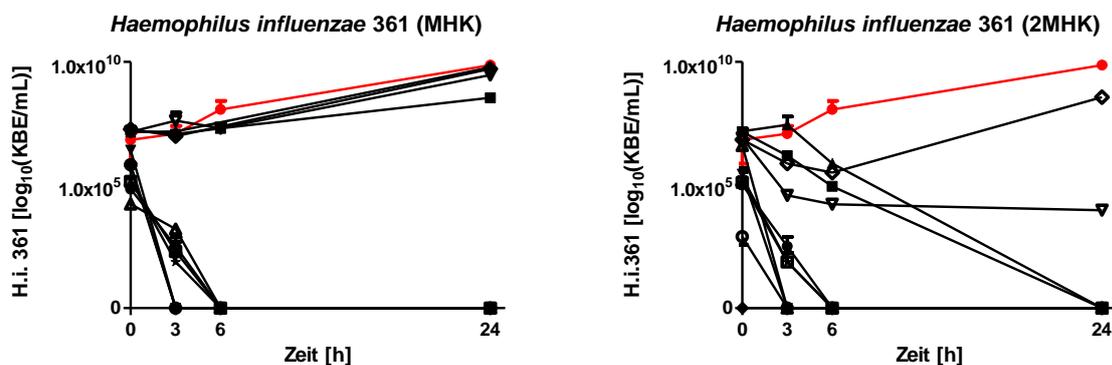


Abbildung 47: Logarithmische Darstellung der Time-Kill Ergebnisse der Modellsubstanzen an *Haemophilus influenzae* 361 anhand der einfachen (links) und doppelten (rechts) minimalen Hemmkonzentration (MHK) nach (169) – dargestellt ist der zeitliche Verlauf der logarithmischen Anzahl der koloniebildenden Einheiten (KBE) pro mL, ● - Negativkontrolle, ■ - Propylenglycol (PG), ▲ - Basisliquid (B), ▼ - Eucalyptusöl (EÖ), ◆ - Nelkenöl (NÖ), ○ - Minzöl (MÖ), □ - Tobramycin (T), △ - Eucalyptusöl-Liquid (EL), ▽ - Nelkenöl-Liquid (NL), ◇ - Minzöl-Liquid (ML), ● - Tobramycin-Liquid (TL), ★ - Cannabidiol-Liquid (CL); Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung ( $n = 2$ )

Wie aus Tabelle 24 hervorgeht, wiesen alle Modellsubstanzen ein sehr breites Spektrum an bakteriziden Aktivitäten sowohl gegen Gram-positive als auch Gram-negative Bakterienarten mit MBK-Werten von  $\geq 48 \cdot 10^{-8}$  bis  $\geq 512$  g/L auf. Die Darstellung gibt die minimalen bakteriziden Konzentrationen in Relation zu ihren ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen wieder.

**Tabelle 24: Ergebnisse der minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) der Modellsubstanzen gegenüber sechs Bakterienarten nach der Time-Kill-Methode nach (169)** – dargestellt sind die minimalen bakteriziden Konzentrationen (MBK) in g/L im Vergleich zu ihren ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen (MHK) anhand der Methode der Mikrodilution. In der Time-Kill-Methode wurden die einfachen und doppelten MHK-Werte verwendet, die Darstellung  $\geq 4$ MHK gibt die nächst höhere geometrische Verdünnung für die Ermittlung einer möglichen minimalen bakteriziden Konzentration an. *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), MS = Modellsubstanz, B = Basisliquid, PG = Propylenglycol, EÖ = Eucalyptusöl, MÖ = Minzöl, NÖ = Nelkenöl, T = Tobramycin, EL = Eucalyptusöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, NL = Nelkenöl-Liquid, CL = Camabidiol-Liquid, TL = Tobramycin-Liquid (n = 7)

MS	P.a. 289		K.p. 245		MRSA 29		S.p. 351		M.c. 358		H.i. 361	
	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]	MBK [g/L]
B	$\geq 512$	$\geq 4$ MHK	$\geq 512$	$\geq 4$ MHK	256	2MHK	256	2MHK	$\geq 256$	$\geq 4$ MHK	128	2MHK
PG	$\geq 256$	$\geq 4$ MHK	256	2MHK	$\geq 256$	$\geq 4$ MHK	$\geq 128$	$\geq 4$ MHK	$\geq 128$	$\geq 4$ MHK	128	2MHK
EÖ	64	MHK	128	MHK	32	MHK	16	MHK	0,5	MHK	2	MHK
MÖ	/	/	256	2MHK	32	MHK	4	MHK	32	MHK	2	MHK
NÖ	128	MHK	16	MHK	16	MHK	1	MHK	1	MHK	0,5	MHK
T	$\geq 8$	$\geq 4$ MHK	$\geq 0,064$	$\geq 4$ MHK	0,5	MHK	$\geq 0,008$	$\geq 4$ MHK	$\geq 48 \cdot 10^{-8}$	$\geq 4$ MHK	0,004	MHK
EL	256	2MHK	256	2MHK	256	MHK	128	MHK	64	2MHK	64	MHK
ML	256	2MHK	256	2MHK	128	MHK	64	MHK	32	2MHK	$\geq 32$	$\geq 4$ MHK
NL	256	2MHK	128	2MHK	64	MHK	64	MHK	$\geq 16$	$\geq 4$ MHK	$\geq 64$	$\geq 4$ MHK
CL	256	MHK	512	2MHK	$\geq 2$	$\geq 4$ MHK	0,5	MHK	$\geq 0,5$	$\geq 4$ MHK	64	MHK
TL	256	2MHK	$\geq 8$	$\geq 4$ MHK	32	MHK	2	MHK	0,008	MHK	4	MHK

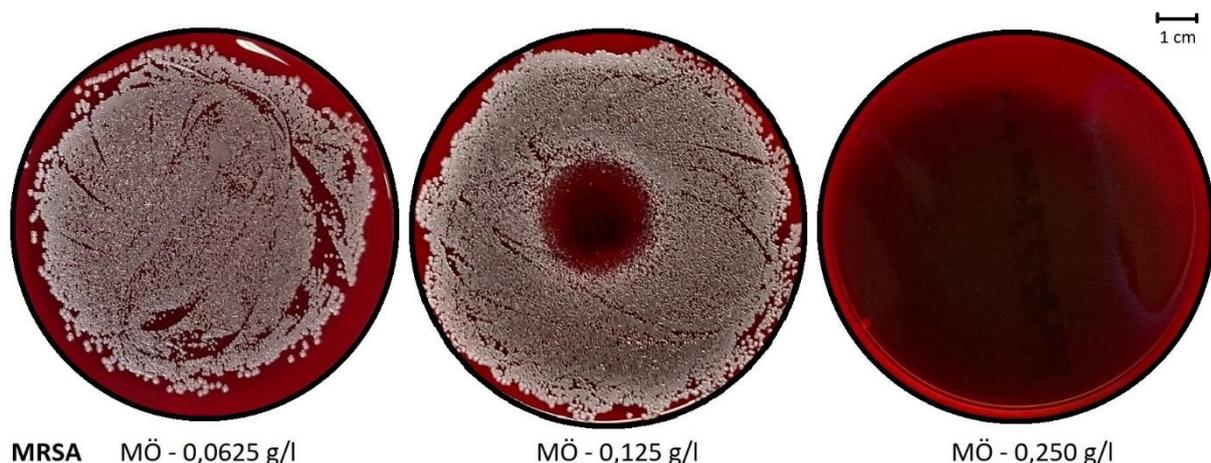
Abschließend konnten alle anhand der Mikrodilution ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen mit der Time-Kill-Methode bestätigt werden. Anhand der Graphiken ist deutlich erkennbar, dass eine Hemmung nach 24 Stunden bei allen Modellsubstanzen für die sechs Bakterienarten gegeben ist. Außerdem konnte bei vielen Modellsubstanzen die minimale Hemmkonzentration mit der minimalen bakteriziden Konzentration gleichgesetzt werden. Dabei konnten die jeweiligen Modellsubstanzen die Population innerhalb der 24 Stunden vollständig inaktivieren. Die bakteriostatischen und bakteriziden Aktivitäten der Modellsubstanzen gegenüber den sechs Bakterienarten zeigen somit ein konzentrations- und zeitabhängiges Muster.

### 5.3.2 Methoden zur Bestimmung der antibakteriellen Wirkung von Aerosolen (indirekte Methoden)

Es gibt keine standardisierte Methode zur Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von Modellsubstanzen im vaporisierten Zustand, deshalb sollten hier drei modifizierte Methoden einen Überblick schaffen über die Möglichkeiten und Grenzen dieser Fragestellung mit und ohne Einsatz der Technologie der elektronischen Zigarette.

#### 5.3.2.1 Gas-Kontakt-Methode

Die quantitative Gas-Kontakt-Methode wurde definiert als Bestimmung der minimalen volatilen Hemmkonzentration, die eine vollständige Inhibierung ( $MHK_{VOL}$ ) bewirkt. Hierfür wurde die Methode von Maruzella und Sicurella aus dem Jahr 1960 modifiziert (176). Die vollständige Wachstumshemmung sollte aufgrund der eigenen Flüchtigkeit der Modellsubstanzen herbeigeführt werden. Die Berechnung der eingesetzten Konzentrationen richtet sich nach dem freien Volumen in der Petrischale im geschlossenen Zustand und wurde in geometrischen Verdünnungsschritten bis zu 16 g/L der Proben umgesetzt. Das Vorhandensein einer freien inhibierten Zone auf dem festen Nährmedium im Vergleich zur Negativkontrolle deutet auf eine antibakterielle Aktivität des Aerosols der Modellsubstanz hin. Die Abbildung 48 stellt beispielhaft das Ergebnis der Untersuchung der Inhibierung von MRSA mit Minzöl dar.



**Abbildung 48:** Untersuchung der Inhibierung anhand der Gas-Kontakt-Methode am Beispiel Minzöl gegenüber MRSA modifiziert nach (176) – dargestellt ist (v.l.n.r.) die höchste Konzentration ohne sichtbare Hemmung (0,0625 g/L), die niedrigste Konzentration mit sichtbarer Hemmung (0,125 g/L) und die minimale volatile Hemmkonzentration mit vollständiger Inhibierung (0,250 g/L) von Minzöl (MÖ) in geometrischen Verdünnungsreihen gegenüber MRSA; MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, (n = 3)

Die linke Platte zeigt die höchste Konzentration ohne sichtbare Hemmung (0,0625 g/L), wobei die mittlere Platte bereits eine Inhibierungszone mittig aufweist und somit die niedrigste Konzentration mit sichtbarer Hemmung (0,125 g/L) darstellt. Die minimale volatile Hemmkonzentration mit vollständiger Inhibierung (MHK<sub>vol</sub>) wird jedoch erst bei einer Konzentration von 0,250 g/L Minzöl (MÖ) erreicht. Die Dämpfe von 10 Modellsubstanzen wurden an sechs Bakterienarten untersucht. Die Tabelle 25 gibt alle ermittelten Ergebnisse wieder. Die maximale untersuchte Konzentration wurde bei 16 g/L festgelegt, somit werden nur die Konzentrationen dargestellt, die eine Inhibierung unter dieser Konzentration bewirken.

Tabelle 25: Untersuchung der minimalen volatilen Hemmkonzentration mit vollständiger Inhibierung (MHK<sub>vol</sub>) anhand der Gas-Kontakt-Methode gegenüber sechs Bakterienarten modifiziert nach (176) – *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), L = Liquid, CBD = Cannabidiol, nu = nicht untersucht, ul = unvollständige Inhibierung bei 16 g/L, - = keine Inhibierung bei 16 g/L (n = 3)

Modellsubstanz	MHK <sub>vol</sub> [g/L]					
	P.a. 289	K.p. 245	MRSA 29	S.p. 351	M.c. 358	H.i. 361
<b>Basisliquid</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Propylenglycol</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Eucalyptusöl</b>	-	-	4	2	1	0,5
<b>Minzöl</b>	-	-	0,25	0,25	0,063	0,25
<b>Nelkenöl</b>	-	-	ul	0,125	1	1
<b>Tobramycin</b>	nu	nu	nu	nu	nu	nu
<b>Eucalyptusöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Minzöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Nelkenöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>CBD-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tobramycin-L</b>	-	-	-	-	-	-

In dieser Testreihe zeigten nur die Dämpfe der reinen ätherischen Öle antibakterielle Eigenschaften. Dieses liegt wahrscheinlich an ihren leichten Volatilitäten im Vergleich zu den anderen Modellsubstanzen. Die Bakterienarten *Pseudomonas aeruginosa* (P.a.) und *Klebsiella pneumoniae* (K.p.) konnten von keiner der untersuchten Modellsubstanzen bis zu einer Konzentration von 16 g/L gehemmt werden. Das Wachstum der anderen vier Bakterien konnte vollständig durch die Dämpfe der reinen ätherischen Öle inhibiert werden, mit Ausnahme von Nelkenöl gegenüber MRSA. Hier konnte allerdings eine sichtbare Hemmung bei 16 g/L bewirkt werden. Die geringste Konzentration an Nelkenöl zur Hemmung von *Streptococcus pneumoniae* lag bei MHK<sub>vol</sub> = 0,125 g/L. Zur Inhibierung mit Minzöl waren 0,25 g/L für die Bakterienarten MRSA, *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) und *Haemophilus influenzae* (H.i.) notwendig, allerdings konnte eine Wachstumshemmung von *Moraxella*

*catarrhalis* (M.c.) bereits bei 0,063 g/L festgestellt werden. Beim Eucalyptusöl sind vergleichsweise höhere Konzentrationen einzusetzen, um eine wachstumshemmende Wirkung auf die Bakterien hervorzurufen. Hier lagen die  $MHK_{VOL}$ -Werte bei 0,5 g/L (H.i.), 1 g/L (M.c.), 2 g/L (S.p.) und 4 g/L (MRSA). Im Vergleich (Tabelle 26) dieser reinen ätherischen Öle und ihrer antibakteriellen Eigenschaften mit den bislang beschriebenen Untersuchungsmethoden der Agardiffusion ( $\emptyset$  [mm]), Mikrodilution (MHK [g/L]) und Gas-Kontakt-Methode ( $MHK_{VOL}$  [g/L]) auf die vier Bakterienarten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae* (S.p.), *Moraxella catarrhalis* (M.c.) und *Haemophilus influenzae* (H.i.) lässt sich schlussfolgern, dass nicht nur jede Untersuchungsmethode mit ihren Grenzen für sich zu betrachten ist, aber auch der Zustand der Probe.

Tabelle 26: Vergleich der Ergebnisse der Agardiffusion (Inhibierungszone  $\emptyset$  [mm], n = 3), der Mikrodilution (MHK [g/L], n = 7) und der Gas-Kontakt-Methode ( $MHK_{VOL}$  [g/L], n = 3) – Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), MS = Modellsubstanz, EÖ = Eucalyptusöl, MÖ = Minzöl, NÖ = Nelkenöl, ul = unvollständige Inhibierung bei 16 g/L, vl = vollständige Inhibierung

MS	MRSA 29			S.p. 351			M.c. 358			H.i. 361		
	$\emptyset$ [mm]	MHK [g/L]	MHK VOL [g/L]	$\emptyset$ [mm]	MHK [g/L]	MHK VOL [g/L]	$\emptyset$ [mm]	MHK [g/L]	MHK VOL [g/L]	$\emptyset$ [mm]	MHK [g/L]	MHK VOL [g/L]
EÖ	11,0	32	4	17,0	16	2	vl	0,5	1	vl	2	0,5
MÖ	31,7	32	0,25	23,0	4	0,25	vl	32	0,063	vl	2	0,25
NÖ	18,3	16	ul	vl	1	0,125	37,3	1	1	31,3	0,5	1

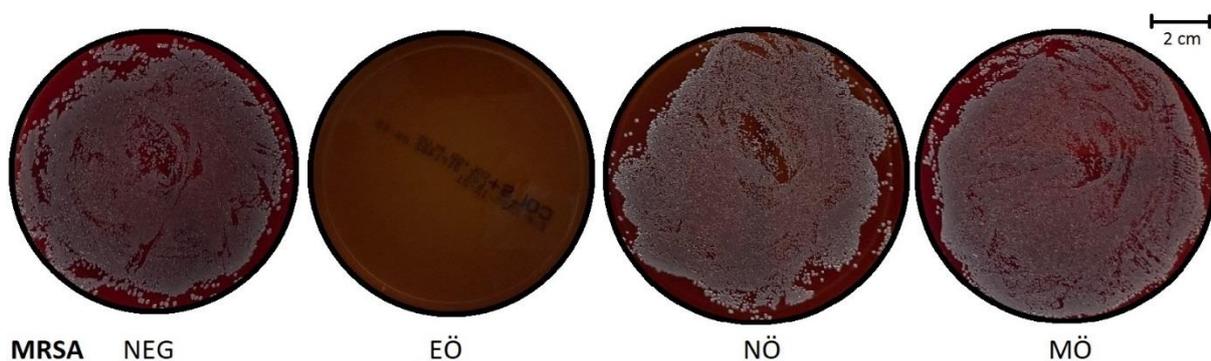
In den Tendenzen kann eine vollständige Inhibierung bzw. ein größerer Durchmesser des Hemmhofes in der Agardiffusion assoziiert werden mit einer geringeren volatilen Hemmkonzentration. Ein Vergleich der Mikrodilution mit der Gas-Kontakt-Methode zeigt übereinstimmende Anordnungen der antibakteriellen Aktivität am Bakterium *Streptococcus pneumoniae* (EÖ < MÖ < NÖ). Die anderen Bakterienarten in der Tabelle 26 weisen auf eine entgegengesetzte Wirkung hin, so dass das ätherische Öl mit der größten Aktivität im flüssigen Zustand die geringste relative Aktivität im aerosolisierten Zustand hat, wie z.B. *Moraxella catarrhalis* mit einer MHK von 32 g/L für Minzöl, jedoch einer  $MHK_{VOL}$  von 0,063 g/L. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sind unterschiedliche Komponenten, die die Aktivität hervorrufen. So können im flüssigen Zustand die Hauptkomponenten die Inhibierung hervorrufen, die Aktivität des Aerosols allerdings wird durch flüchtige Bestandteile oder durch Umwandlungen von Komponenten in der Luft bewirkt. Eine Publikation von Ács *et al.* führte eine vergleichbare Gas-Kontakt-Methode durch und ermittelte ähnliche Werte für evaporisierte ätherische Öle. So konnten MHK-Werte der Bakterien *Streptococcus pneumoniae* (EÖ = 1,2 mL/L, NÖ = 0,015 mL/L), *Moraxella catarrhalis* (EÖ = 0,225 mL/L, NÖ = 0,125 mL/L) und *Haemophilus*

*influenzae* (EÖ = 0,125 mL/L, NÖ = 0,09 mL/L) mit den jeweiligen ätherischen Ölen ermittelt werden. Die Schwankungen sind auf unterschiedliche Isolate der Bakterienarten, Bezugsquellen der ätherischen Öle und Modifikationen in der Methode zurückzuführen (217). In der Publikation von Fuochi *et al.* konnten sogar 100 µL eines zusatzfreien Basisliquids eine bakteriostatische Wirkung für Bakterienisolate von *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603) und *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) verursachen. Das ergibt etwa einen Wert von 1,5 g/L bezogen auf die Gas-Kontakt-Methode dieser Arbeit. Obwohl die Methodik Übereinstimmungen aufweist, ist dieser Wert doch stark zu hinterfragen (205).

Die Grenze dieser Methode besteht in der qualitativen und quantitativen Bestimmung der tatsächlich evaporierten Komponenten, aber auch der diffundierten Substanzen in das feste Medium. Für eine quantitative Aussage der Substanzen müssten die Gasphase und das Medium chromatographisch separat aufgearbeitet und analysiert werden.

#### 5.3.2.2. Sättigungsbox

Das qualitative Prinzip der Sättigungsbox beruht auf einer modifizierten Methode von Inouye *et al.* aus dem Jahr 2001 (177). Eine luftdichte Box mit definiertem Innenvolumen ( $V = 500 \text{ mL}$ ) wurde verwendet, um die Hemmung durch eine vollständige Sättigung der Atmosphäre mit der Modellsubstanz unter definierten Bedingungen herbeizuführen. Die Abbildung 49 stellt ein Ergebnis am Beispiel von MRSA durch Sättigung mit den ätherischen Ölen Eucalyptusöl (EÖ), Nelkenöl (NÖ) und Minzöl (MÖ) dar.



**Abbildung 49: Untersuchung der Inhibierung anhand der Methode der Sättigungsbox am Beispiel MRSA modifiziert nach (177)** – dargestellt sind die Ergebnisse (v.l.n.r.) der Negativkontrolle (NEG) und der drei reinen ätherischen Öle: Eucalyptusöl (EÖ), Nelkenöl (NÖ) und Minzöl (MÖ); MRSA = Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, ( $n = 3$ )

In diesem Beispiel konnte eine vollständige Inhibierung nur durch das Eucalyptusöl erreicht werden. Die mit Nelkenöl und Minzöl gesättigten Boxen konnten keine Inhibierung bewirken und sind somit vergleichbar mit der Negativkontrolle. Die vollständigen Ergebnisse der Sättigungsbox sind in folgender Tabelle 27 dargestellt.

Tabelle 27: Untersuchung der vollständigen Inhibierung anhand der Methode der Sättigungsbox modifiziert nach (177) – *Pseudomonas aeruginosa* (P.a. 289), *Klebsiella pneumoniae* (K.p. 245), Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), L = Liquid, CBD = Cannabidiol, X = Inhibierung durch Sättigung, nu = nicht untersucht, - = keine Inhibierung, (n = 3)

Modellsubstanz	Inhibierung durch Sättigung (X)					
	P.a. 289	K.p. 245	MRSA 29	S.p. 351	M.c. 358	H.i. 361
<b>Basisliquid</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Propylenglycol</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Eucalyptusöl</b>	-	-	X	X	X	X
<b>Minzöl</b>	-	-	-	X	X	X
<b>Nelkenöl</b>	-	-	-	X	-	-
<b>Tobramycin</b>	nu	nu	nu	nu	nu	nu
<b>Eucalyptusöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Minzöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Nelkenöl-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>CBD-L</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Tobramycin-L</b>	-	-	-	-	-	-

Auch mit dieser Methode zeigten nur die gesättigten Dämpfe der reinen ätherischen Öle antibakterielle Eigenschaften. Dieses liegt, wie bereits in der Gas-Kontakt-Methode begründet, wahrscheinlich an ihren leichten Flüchtigkeiten, begründet im niedrigen Molekulargewicht und hohem Dampfdruck bei Raumtemperatur, im Vergleich zu den anderen Modellsubstanzen. Ein direkter Vergleich beider Methoden ist in Tabelle 28 dargestellt.

Tabelle 28: Vergleich der Ergebnisse der Sättigungsbox (X, n = 3) und der Gas-Kontakt-Methode (MHK<sub>vol</sub> [g/L], n = 3) – Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA 29), *Streptococcus pneumoniae* (S.p. 351), *Moraxella catarrhalis* (M.c. 358), *Haemophilus influenzae* (H.i. 361), MS = Modellsubstanz, EÖ = Eucalyptusöl, MÖ = Minzöl, NÖ = Nelkenöl, ul = unvollständige Inhibierung bei 16 g/L, X = Inhibierung durch Sättigung

MS	MRSA 29		S.p. 351		M.c. 358		H.i. 361	
	Sättigung	MHK <sub>vol</sub> [g/L]						
<b>EÖ</b>	X	4	X	2	X	1	X	0,5
<b>MÖ</b>	-	0,25	X	0,25	X	0,063	X	0,25
<b>NÖ</b>	-	ul	X	0,125	-	1	-	1

Die antibakteriellen Eigenschaften von ätherischen Ölen in der Gasphase sind bereits bekannt (218, 219). Den Vergleich zwischen den beiden geschlossenen Systemen der Gas-Kontakt-Methode und der Sättigungsbox machten auch Inouye *et al.* im Jahr 2001. Sie stellten fest, dass die schnelle

Evaporation und der geringere Bedarf an ätherischem Öl der Gas-Kontakt-Methode der Sättigungsbox überlegen war. Für eine vollständige Inhibierung wurde etwa 6% der Konzentration aus der Sättigungsbox benötigt. Das Filterplättchen wurde so platziert, dass der Zwischenraum nur einige Millimeter beträgt, wohingegen das Glasgefäß der Sättigungsbox neben der Petrischale platziert wurde und der Kontakt nicht unmittelbar stattfand. Es bedarf einiger Zeit (1 – 2 Stunden) bis zur Einstellung des Gleichgewichtes und somit bis zur Diffusion in das Medium. Es konnte bereits beobachtet werden, dass Aldehyde und Phenole gefolgt von Alkoholen die stärksten antimikrobiellen Aktivitäten aufweisen, aber auch, dass instabile Bestandteile in der Luft oxidiert werden und sich die Aktivitäten ändern können (220). Aufgrund des geringeren Raumvolumens der Gas-Kontakt-Methode ist die Aktivität der Evaporation stärker. Die Reproduzierbarkeit beider Methoden ist insbesondere bei der Untersuchung der ätherischen Öle erst durch eine luftdichte Versiegelung möglich (221, 222).

Die Grenze dieser Methode besteht in ihrer qualitativen Bestimmung, da nur eine Sättigungshemmung bestimmt wird und nicht die minimale Hemmkonzentration eines geschlossenen gesättigten Systems. Im Gegensatz zur Gas-Kontakt-Methode mit einem unmittelbaren Kontakt der evaporierten Modellsubstanz, ist hier ein bestimmtes größeres Raumvolumen zu betrachten. Dieser Aspekt macht sie ebenfalls zur aufwendigeren Methode, da jede inokulierte Petrischale in einer eigenen luftdicht verschlossenen Box inkubiert werden muss.

### 5.3.2.3. Aerosol-Untersuchungen

Die Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen stellen die antibakterielle Wirkung der Aerosole beim Durchleiten durch eine Bakteriensuspension im zeitlichen Verlauf unter definierten Bedingungen dar. Hierfür wurde die Probenahme-Konstruktion (Abbildung 20) wie in den vorherigen Untersuchungen verwendet. Anstelle des Lösungsmittels wurde die entsprechende bakterielle Suspension in die Waschflasche gefüllt und nach Verdampfungsprotokoll (Tabelle 5) bedampft. Die Wirkung des durchgeleiteten Aerosols wurde anhand von Probenahme und Inkubation der ausplattierten Suspension in Abständen von 10 Zügen dokumentiert. Jede Versuchsreihe wurde zum Vergleich mit wirkstofffreiem Basisliquid (B) bedampft. Da das Basisliquid auch geringe antibakterielle Aktivitäten in der Mikrodilution aufzeigte, kann dies nicht als Negativkontrolle definiert werden, allerdings wird der Unterschied zu einem Liquid mit Wirkstoff deutlich. Aufgrund der sehr geringen antibakteriellen Aktivität der Modellsbstanz in der Mikrodilution gegenüber den multiresistenten Bakterienarten wurden die Aerosol-Untersuchungen an den drei vergleichsweise Antibiotika-sensiblen Isolaten der Bakterienarten *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und *Moraxella catarrhalis* durchgeführt. Hierfür wurden bestimmte Modellsbstanz mit den jeweils geringsten ermittelten MHK-Werten verwendet. Die Einhaltung des Verdampfungsprotokolls führte in Voruntersuchungen zu sehr langen Untersuchungsdurchläufen, aufgrund dessen wurde eine Leistung von 60 Watt gewählt, um diese Zeitspanne geringfügig zu verkürzen. Aus der Tabelle 29 sind die getesteten Kombinationen zu entnehmen.

Tabelle 29: Untersuchungsschema der Aerosol-Untersuchungen an ausgewählten Bakterienarten mit ausgewählten Modellsbstanz und der Leistung der e-Zigarette – B = Basisliquid, NL = Nelkenöl-Liquid, ML = Minzöl-Liquid, CL = Cannabidiol-Liquid, (n = 2)

Bakterienart	Modellsbstanz				Leistung [Watt]
	B	NL	ML	CL	
<b><i>Streptococcus pneumoniae</i> 351</b>	X	X		X	60
<b><i>Haemophilus influenzae</i> 361</b>	X	X	X		60
<b><i>Moraxella catarrhalis</i> 258</b>	X	X			60
	X	X		X	20

Die roten Datenreihen stellen jeweils die Ergebnisse der Aerosole aus wirkstofffreiem Basisliquid dar. Die Verläufe geben die koloniebildenden Einheiten normiert auf 100% des Anfangswertes zu der Anzahl der Züge bzw. deren Probenahme wieder. Die Ergebnisse des Bedampfens von *Streptococcus pneumoniae* 351 sind in der folgenden Abbildung 50 graphisch dargestellt.

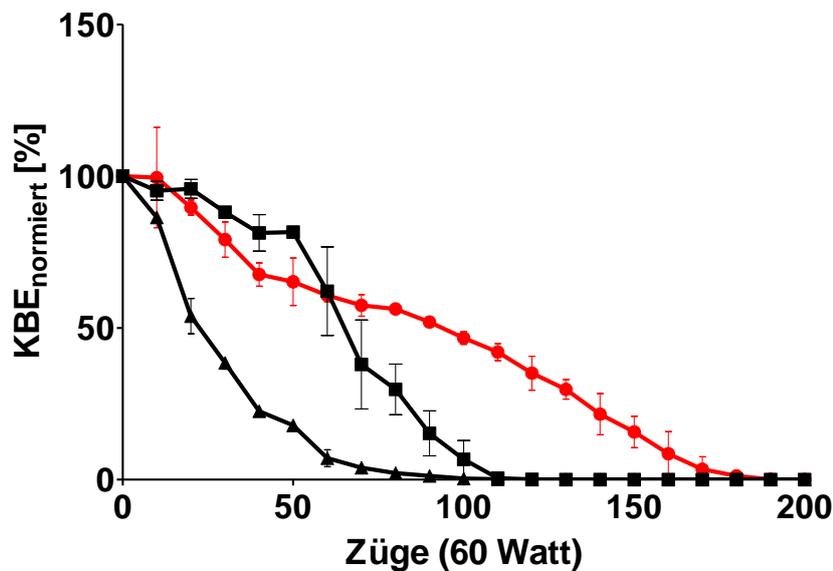


Abbildung 50: Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsustanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Cannabidiol-Liquid an *Streptococcus pneumoniae* 351 – dargestellt sind die normierten koloniebildenden Einheiten (KBE) in Prozent gegen die Anzahl der Züge nach Bedampfen bei 60 Watt, ● – Basisliquid, ■ - Nelkenöl-Liquid, ▲ – Cannabidiol-Liquid; Mittelwert ± Standardabweichung (n = 2)

Für diese Untersuchung wurden die Modellsustanzen Nelkenöl-Liquid (MHK = 64 g/L) und Cannabidiol-Liquid (MHK = 0,5 g/L) im Vergleich zum Basisliquid (MHK = 128 g/L) und einer Leistung von 60 Watt ausgewählt. Die Absterberate verläuft bei allen Modellsustanzen unterschiedlich und ist in der Anordnung der vollständigen Bakterizidie vergleichbar mit den minimalen Hemmkonzentrationen. Eine vollständige Abtötung tritt nach Bedampfen mit Cannabidiol-Liquid nach 120 Zügen ein. Der abnehmende Verlauf ist jedoch zügiger verglichen mit dem Bedampfen mit Nelkenöl-Liquid. Hier wurde die Bakterizidie nach 130 Zügen ermittelt. Das Basisliquid hingegen hat eine annähernd lineare Hemmung, die nach 200 Zügen keine koloniebildenden Einheiten aufzeigt.

Die Abbildung 51 stellt die normierten Absterberaten der Bakterienart *Haemophilus influenzae* 361 im Vergleich zum Anfangswert dar.

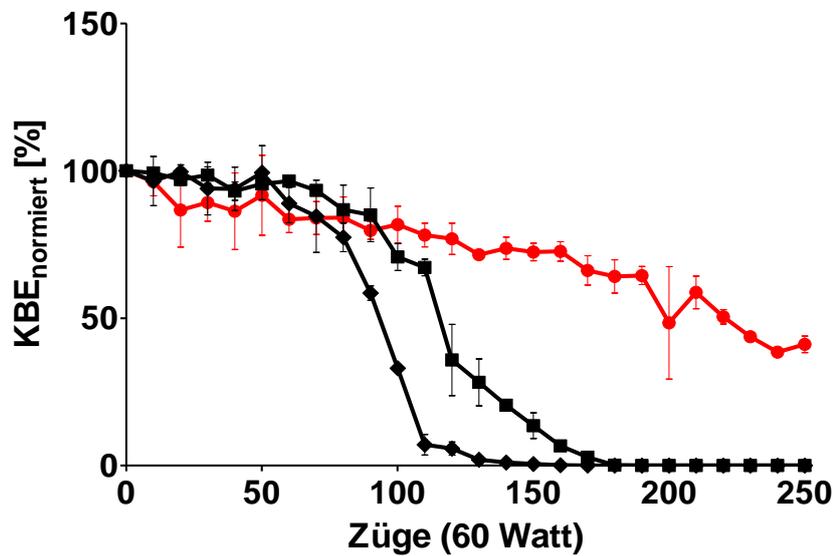


Abbildung 51: Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsustanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Minzöl-Liquid an *Haemophilus influenzae* 361 – dargestellt sind die normierten koloniebildenden Einheiten (KBE) in Prozent gegen die Anzahl der Züge nach Bedampfen bei 60 Watt, ● – Basisliquid, ■ - Nelkenöl-Liquid, ◆ – Minzöl-Liquid; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n = 2)

Ein deutlicher Unterschied der Absterberaten zwischen den Aerosolen des Nelkenöl-Liquids (MHK = 16 g/L) und Minzöl-Liquids (MHK = 8 g/L) mit dem Basisliquid (MHK = 64 g/L) ist erkennbar. Bei einer Leistung von 60 Watt konnte das Bedampfen mit Basisliquid lediglich eine Hemmung des Bakterienwachstums verursachen. Diese liegt nach etwa 220 Zügen bei 50% im Vergleich zum Ausgangswert der koloniebildenden Einheiten. In der Tendenz würde eine Weiterführung der Untersuchung eine Abtötung bewirken. Die beiden Liquids mit ätherischen Ölen haben ähnliche Hemmungsverläufe. Die Bakterizidie tritt beim Minzöl-Liquid bereits nach 180 Zügen ein. Das Nelkenöl-Liquid hingegen tötete die Bakterien nach 200 Zügen vollständig ab.

Die Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen von *Moraxella catarrhalis* 258 sind in Abbildung 52 dargestellt. Die Graphen zeigen einen vergleichenden Verlauf der Absterberate bei Variation der Leistung der e-Zigarette, wobei A das Bedampfen bei 60 Watt und B bei 20 Watt darstellt.

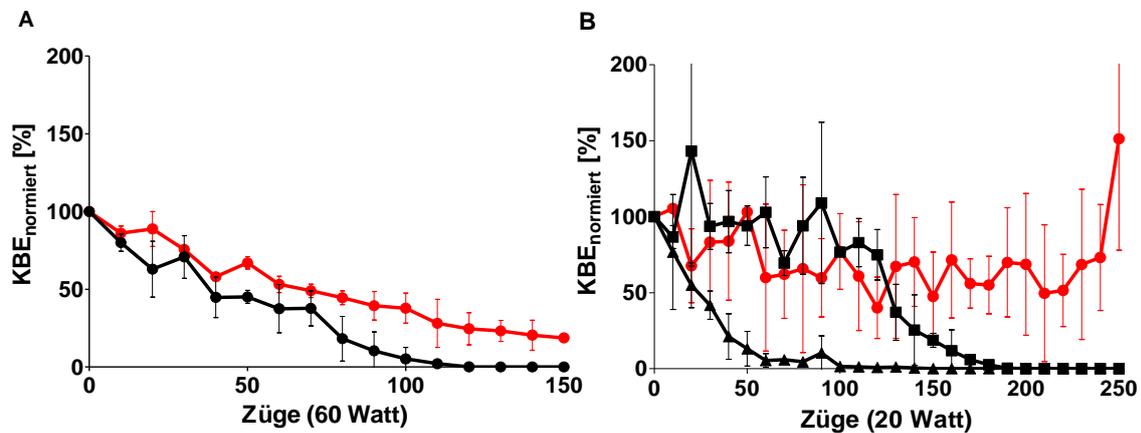


Abbildung 52: Ergebnisse der Aerosol-Untersuchungen der Modellsustanzen Basisliquid, Nelkenöl-Liquid und Cannabidiol-Liquid an *Moraxella catarrhalis* 258 – dargestellt sind die normierten koloniebildenden Einheiten (KBE) in Prozent gegen die Anzahl der Züge nach Bedampfen bei 60 Watt (A) und 20 Watt (B), ● – Basisliquid, ■ - Nelkenöl-Liquid, ▲ – Cannabidiol-Liquid; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (n = 2)

Die normierten koloniebildenden Einheiten der beiden Modellsustanzen Basisliquid (MHK = 64 g/L) und Nelkenöl-Liquid (MHK = 4 g/L) zeigten bei 60 Watt einen sinkenden Verlauf. Die vollständige Abtötung ist beim Nelkenöl-Liquid nach 120 Zügen erreicht. Das Basisliquid konnte eine 50%ige Hemmung nach 70 Zügen verursachen, jedoch nach 150 Zügen keine Bakterizidie bewirken. Die Untersuchungen bei 20 Watt zeigten zwar einen sehr schwankenden Verlauf und teilweise hohe Standardabweichungen im Vergleich zu der höheren Leistung, jedoch ist der Trend der untersuchten Modellsustanzen deutlich. Das Basisliquid schwankt sehr stark in der Hemmung, hat jedoch keinen bakteriziden Trend. Eine bakterio-statische Wirkung ist ebenfalls nicht anzunehmen, da es nach 210 Zügen wieder zu einem vermehrten Bakterienwachstum kommt. Das Cannabidiol-Liquid (MHK = 0,125 g/L) verursacht bereits nach 150 Zügen eine vollständige Abtötung. Diese bakterizide Wirkung wird beim Nelkenöl-Liquid erst nach 200 Zügen beobachtet.

In allen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die erzeugten Aerosole antibakterielle Wirkungen aufweisen. Dabei wird die Hemmung durch Zugabe eines Wirkstoffes zum Basisliquid verstärkt und führt zur Bakterizidie. Das reine Basisliquid selbst hat diese Wirkung jedoch ebenfalls (223). Die Zeitdauer zum Wirkeintritt wird jedoch beeinflusst von anderen Variablen wie der Leistung der e-Zigarette. Die minimalen Hemmkonzentrationen scheinen dabei keinen direkten

proportionalen Bezug zum Bedampfen zu haben. Diese Ergebnisse können auch nur bedingt mit den quantitativen chromatographischen Untersuchungen verglichen werden, da unterschiedliche Lösungsmittel zum Einsatz kamen. In den chromatographischen Untersuchungen wurde zum Lösen der Aerosole gezielt ein Lösungsmittel gesucht, welches sowohl verträglich für die instrumentelle Analytik ist als auch alle untersuchten Modellsubstanzen löst. Das Ziel war eine möglichst geringere Probenaufbereitung, um Verluste zu vermeiden. In der Mikrobiologie allerdings liegt der Fokus auf der Kultivierung der Bakterien, um die Wirkung der Behandlung bestimmen zu können. Deswegen wird hier eine optimale Umgebung geschaffen durch Einsatz von Nährmedien. Die eingesetzten Wirkstoffe haben als Aerosol eine deutliche antibakterielle Wirkung. Die Bestandteile des Basisliquids haben bereits beschriebene antibakterielle Eigenschaften in aerosolierter Form. In einer Publikation von Manconi *et al.* konnten Glycerin und Propylenglycol sogar die Langzeitstabilität von Flüssigformulierungen aufgrund ihrer konservierenden Wirkung verbessern (224). Eine potentielle Anwendung der beiden Substanzen als selbst konservierendes Vehikel könnte die Anzahl der weiteren Bestandteile des medizinischen Liquids und damit potentielle Nebenwirkungen von Zusatzstoffen minimieren. In unterschiedlichen Fall- und Beobachtungsstudien wird über verbesserte Zustände aufgrund von Konsum elektronischer Zigaretten berichtet. Tabakraucher, die auf das Dampfen von e-Zigaretten umsteigen, beschreiben einen Rückgang von Atemwegsinfektionen (225). Ein Nichtraucher mit chronischer *Staphylococcus aureus*-Infektion berichtete über die vollständige Beseitigung der Besiedlung nach regelmäßigem Dampfen (226). Diese Aussagen sind jedoch sehr subjektiv und es bedarf weiterer Studien mit objektiven Messungen. Allerdings wurde die bakterizide Wirkung von Propylenglycol-Aerosolen zur Bekämpfung von Atemwegsinfektionen als Methode der chemischen Luftsterilisation bereits im Jahr 1942 beschrieben. Dabei konnten für den Menschen unbedenkliche Konzentrationen von 1 g Propylenglycol etwa 3 - 4 Millionen Bakterien pro cm<sup>3</sup> in einer Kammer vollständig und schnell abtöten im Gegensatz zur relativ geringen Hemmung bei direktem Kontakt mit der flüssigen Substanz. Diese Ergebnisse konnten im Mausmodell bestätigt werden, indem ein feiner Nebel an Pneumokokken in einer Mausekammer versprüht wurde. Die Kontrollgruppe blieb weiter unbehandelt und die Mäuse starben an einer Infektion. Die Versuchsgruppe wurde mit dem Propylenglycol-Aerosol behandelt und überlebte. Als Erklärung für diese Beobachtung nannten die Forscher die Hygroskopie der Substanz, die die Feuchtigkeit aus der Luft entzieht und somit die Bakterien austrocknet (223). Diese Annahme kann jedoch nicht gänzlich auf die Anwendung einer e-Zigarette übertragen werden. Wie bereits erwähnt, kann es bei der Hitzebehandlung von Bestandteilen des Basisliquids zur Bildung von Carbonyl-Verbindungen wie Formaldehyd, Acetaldehyd und Acrolein kommen (91–95). Prinzipiell zeigten jedoch die meisten Studien, dass die Art und Menge der gebildeten Carbonyl-Verbindungen stark von der Leistung der e-Zigarette, der Zusammensetzung des Liquids, fehlenden technischen Sicherheitsvorkehrungen und dem Verhalten des Anwenders

abhängt. Diese Verbindungen können ebenfalls eine potentielle bakteriostatische und bakterizide Wirkung an den untersuchten Bakterienarten hervorrufen. Allerdings werden sie durch Oxidation der Verneblungsmittel Glycerin und Propylenglycol den Hauptbestandteilen der untersuchten Liquids hergestellt. Eine eindeutige Unterscheidung zwischen wirkstofffreien und wirkstoffhaltigen Aerosolen wie in den Ergebnissen dieser Untersuchungen wäre womöglich schwieriger. Aus der Literatur ist bekannt, dass Nelkenöl bzw. die Hauptkomponente Eugenol ausgeprägte antimikrobielle Eigenschaften aufgrund der relativ hohen Wasserlöslichkeit aufweisen. Das Wirkungsspektrum ist sowohl in der flüssigen Anwendung als auch in der Dampfphase *in vitro* breit aufgestellt. Es wurde bereits beobachtet, dass es zu erheblichen Unterschieden in den Ergebnissen der Hemmung kommen kann (122). Eine antimikrobielle Wirkung in der Dampfphase wird wohl verursacht von sehr flüchtigen Komponenten ätherischer Öle meist Monoterpenen und Estern. Im Vergleich zu diesen Vielstoffgemischen, die natürlicher Variabilität unterliegen, führt die Testung von Cannabidiol zu einheitlichen Ergebnissen. Die Zusammensetzung beeinflusst demnach die Wirkung. Die Ergebnisse dieser Aerosol-Untersuchungen haben gezeigt, dass die eingesetzten Wirkstoffe die antibakterielle Aktivität von Propylenglycol und Glycerin erheblich verstärken können. Die Erzeugung von tobramycinhaltigen Aerosolen führte in Voruntersuchungen bereits bei einer Leistung von 20 Watt zu einer deutlichen Zersetzung der Substanz mit Zunahme der Zyklen (Ergebnisse nicht dargestellt). Dieses wurde durch eine ausgeprägte bräunliche Verfärbung des Tobramycin-Liquids im Tank sichtbar, was aufgrund der molekularen Struktur auf eine Maillard-Reaktion hindeutet. Es ist ebenfalls davon auszugehen, dass die Zersetzungstemperatur von Tobramycin bei weit unter 300°C erreicht wurde. Diese Untersuchungen müssen jedoch weiterverfolgt und der potentielle Einsatz von thermisch instabilen Substanzen durch technische Modifizierungen ermöglicht bzw. hinterfragt werden. Für die künftige Forschung wird es wichtig sein, die Auswirkungen von durch elektronische Geräte aerosolisierten Liquids auf Bakterienstämme zu untersuchen, denn auch das natürliche Mikrobiom ist bei Gebrauch zu Genusszwecken betroffen. Die Untersuchung einzelner Bakterienisolate gibt nur eingeschränkt Aufschluss über die antibakteriellen Eigenschaften von Substanzen gegenüber der gesamten Bakterienart. Diese Arbeit zeigt lediglich die potentielle Möglichkeit, dass Bakterien anhand von mit e-Zigaretten erzeugten Aerosolen im Wachstum gehemmt oder abgetötet werden können. Somit kann auch die potentielle Anwendung der Inhalationstechnologie der e-Zigarette für antibakterielle Strategien bestätigt werden. Allerdings bedarf die Bestätigung von Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der Formulierung weiterer mikrobiologischer Untersuchungen und klinischer Studien.

## 6. Fazit und Ausblick

Atemwegserkrankungen gehören zu den weltweit häufigen und stetig zunehmenden Ursachen für Todesfälle und Erwerbsunfähigkeit. Zu den fünf schwerwiegenden respiratorischen Erkrankungen gehören die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), Asthma bronchiale, akute Infektionen der unteren Atemwege, Tuberkulose und Lungenkrebs. Die Kontrolle, Prävention und Heilung von respiratorischen Erkrankungen gehören zu den wichtigsten und kosteneffektivsten Gesundheitsmaßnahmen. Die oberste Priorität sollte dabei die Stärkung des Bewusstseins über die Bedeutung der Atemgesundheit für die globale Gesundheitssituation sowie die Möglichkeit des universellen Zugangs zur Gesundheitsversorgung bzw. die Verfügbarkeit kostengünstiger, qualitätsgeprüfter Maßnahmen haben (1). Eine direkte topische Behandlung von Atemwegserkrankungen am Wirkort in Form einer inhalativen Applikation bietet dabei viele Vorteile gegenüber einer systemischen Therapie. Die medizinische Applikation von Wirkstoffen über die Lunge ist jedoch eine komplexe Herausforderung. Die Auswahl an Inhalatoren ist vielfältig und individuell anpassbar, bedarf allerdings für eine erfolgreiche Praxis die Schulung des Anwenders, denn unterschiedliche Atemtechniken führen zu variierenden Wirksamkeiten. Die Handhabung ist meist individuell und muss modellspezifisch veranschaulicht werden. Inhalatoren gehören zu den erklärungsbedürftigen Applikationsformen, die zur Erhöhung der Patienten-Compliance so einfach, wie möglich geschaltet werden müssen (2). Parallel besitzen und gebrauchen 68 Millionen Menschen weltweit die Technologie eines inhalativen Applikators zur bewussten Schädigung ihrer Gesundheit in Form einer elektronischen Zigarette (3). Diese Technologie bietet die potentielle Möglichkeit einer verfügbaren, erschwinglichen und qualitätsgeprüften Gesundheitsmaßnahme zur Kontrolle, Prävention und Heilung von Atemwegserkrankungen.

Diese Arbeit dient als Beitrag für die potentielle Entwicklung der Technologie der e-Zigarette zu einem Medizinprodukt in Form eines inhalativen Applikationssystems von Wirkstoffen (EDDS). Sie konzentrierte sich auf drei Schwerpunkten anhand von ausgewählten Modellsubstanzen – der quantitativen und qualitativen Untersuchungen der Liquids bzw. Aerosole, den Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und ausgewählten Enzymsystemen *in vitro* und den Untersuchungen von antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro*. In den quantitativen und qualitativen Untersuchungen konnten spezifische Verdampfungsprofile der Wirkstoffe gezeigt werden. Dabei stieg die verdampfte Masse der Leitsubstanzen der ätherischen Öle 1,8-Cineol (Eucalyptusöl), Menthol (Minzöl) und Eugenol (Nelkenöl) linear zur Konzentration im Liquid im Bereich zwischen 0,5% und 1,5%. Die Freisetzungsrate von Cannabidiol hingegen schien unabhängig von der Konzentration im Liquid zu sein. Dieses konnte an fünf CBD-haltigen Liquids im

Konzentrationsbereich zwischen 31 µg/g und 5120 µg/g Liquid gezeigt werden. Diese Tatsache führt zu der Annahme, dass jeder Wirkstoff bzw. jede Substanzklasse individuell zu bewerten ist und Inhalator und Formulierung aufeinander abgestimmt werden müssen. Der Einsatz als Medizinprodukt zur Applikation von Arzneimitteln setzt stets Prüfungen nach Europäischem Arzneibuch voraus. Die Charakterisierung erfolgt über die Freisetzungsrates des Wirkstoffs und der Gesamtmenge an abgegebenem Wirkstoff mithilfe eines Atmungssimulators sowie die aerodynamische Beurteilung der abgegebenen Aerosole. Dabei muss die Gleichförmigkeit des Gehaltes und der Masse sichergestellt werden. Die Prüfungskriterien von Inhalatoren nach Europäischem Arzneibuch verweisen jedoch ebenfalls auf Spezifikationen, die in Zulassungen definiert sind und diese werden unter anderem über die klinischen Prüfungen bestimmt. Dieses lässt den Schluss zu, dass die drei beschriebenen Inhalator-Technologien zur medizinischen Anwendung eigene standardisierte Prüfungen in den jeweiligen Zulassungen regeln. Es wurden in der Literatur technische Schwächen der Inhalatoren beschrieben, die die e-Zigarette nicht aufweist. Die aktive atemzuggesteuerte Technik erzeugt ein Aerosol, welches direkt inhaliert werden kann. Der Überhitzungsschutz von 10 Sekunden definiert die maximal mögliche Aerosol-Erzeugung pro Zug. Im Vergleich dazu führt die Technologie der Vernebler zu einem erheblichen Wirkstoffverlust aufgrund der kontinuierlichen passiven Aerosol-Erzeugung. Der Wirkstoff verteilt sich hauptsächlich in der Luft und auf bestimmten Gesichtspartien des Anwenders. Die Dosier- und Pulverinhalatoren weisen sehr große anwenderindividuelle Schwankungen auf. Es wird regelmäßig in Fachzeitschriften und Publikationen darüber berichtet, dass 50 – 90% der Patienten medizinische Inhalatoren inkorrekt anwenden (227–229). Die Inhalation mithilfe einer e-Zigarette ist dagegen intuitiv und bedarf keiner speziellen Atemtechnik. Die optimalen Partikelgrößen für die pulmonale Applikation sind zwischen 1 – 5 µm MMAD. Die Erzeugung dieser Partikel ist sowohl mit den medizinischen Inhalatoren als auch mit der e-Zigarette möglich. Allerdings werden ebenfalls Partikelgrößen außerhalb dieses Bereiches erzeugt, sodass nur 9 – 14,5% der gesamten Nenndosis in der Lunge deponiert werden kann (17). Das führt zu Wirkstoffverlusten aufgrund von Impaktion an Geräteteilen der Inhalatoren und am Oropharynx. Zumindest der Verlust an Geräteteilen sollte minimal bei der e-Zigarette sein, da eine direkte und sehr kurze Verbindung zwischen Mund und Verdampferinheit besteht. Diese Messungen sollten jedoch parallel mit der e-Zigarette durchgeführt und aktualisiert werden, um vergleichende quantifizierbare Ergebnisse zu erhalten. Die pulmonale Applikation von Arzneimitteln ist komplex und variabel. Die Wirksamkeit von inhalativen Therapien ist von vielen Faktoren abhängig. Die Partikelgröße des Wirkstoffes bestimmt das pharmakokinetische Profil und somit die pharmakodynamische Wirkung sowohl topisch als auch systemisch. Zusätzlich hängt die Absorption des Wirkstoffes von deren physikalisch-chemischen Eigenschaften und der physiologischen Barrieren am Wirkort ab. Die Zielregion hängt demnach vom beabsichtigten therapeutischen Zweck und dem Krankheitsbild ab. Für topische Behandlungen (z.B. Asthma, COPD)

sind hohe Lungenkonzentrationen für eine maximale lokale Wirksamkeit bei minimalen systemischen Nebenwirkungen notwendig. Für die systemische Wirkungsweise hingegen sind eine hohe Absorption und Bioverfügbarkeit entscheidend. Bei der Entwicklung einer pulmonalen Therapie muss demnach für die Kontrolle der Partikeldeposition ein gutes Verständnis des Inhalators vorhanden sein. Die Massenproduktion der e-Zigarette ist realisierbar und kostengünstig. Durch Modifizierungen könnte eine Dosierung gut kontrollierbar gemacht werden, aber auch die Partikelgrößenverteilung kann insoweit reguliert werden, dass die Wirkstoffe je nach Partikelgröße zu einem geeigneten Applikationsort, wie Mund, Rachen oder Bronchien, transportiert werden. In einer Publikation von Scheunemann *et al.* wird die Möglichkeit einer e-Zigarette als medizinischer Inhalator bereits beschrieben. Die Untersuchungen zur Aerosolerzeugung ermittelten tendenziell kleinere Tröpfchen bei größeren Zuggeschwindigkeiten. Daraus wurde geschlossen, dass die elektronische Einstellung die Deposition in unterschiedlichen Bereichen der Atemwege je nach Partikelgrößenerzeugung ermöglichen könnten (230). Diese mögliche Regulierung von Partikelgrößen über die technischen Parameter der thermischen Aerosolerzeugung wäre vorteilhaft gegenüber anderen Inhalatoren bei thermisch stabilen Wirkstoffen. Der Vergleich mit den medizinischen Inhalatoren führt zu dem Schluss, dass die Technologie der e-Zigarette durchaus eine gleichartige Performance für thermisch stabile Wirkstoffe bieten könnte. Dieses fiktive Medizinprodukt muss aus zwei Bauteilen bestehen, die nicht nachfüllbar und nicht manipulierbar sind und die Gesamtleistung nicht beeinflussen. Das erste Bauteil ist eine hersteller-unspezifisch produzierte, wieder aufladbare Energiequelle mit Universalgewinde zum mehrfachen Gebrauch. Das zweite Bauteil ist eine hersteller- und wirkstoffspezifisch produzierte Einheit, bestehend aus dem Verdampfer und einem Arzneimittel. Das Arzneimittel, ein medizinisches Liquid (Träger und Wirkstoff) wird in dem Tank des Verdampfers mit konstanten, nicht variablen Parametern patientenindividuell produziert. Durch vorherige Validierungen können die gewünschten Dosierungen individuell hergestellt und appliziert werden. Das zweite Bauteil bildet demnach die ärztlich verschreibungspflichtige oder rezeptfreie Einheit, deren Expositionsbedingungen standardisiert und überwacht werden müssen.

In den Untersuchungen der Wechselwirkungen zwischen den Liquids bzw. Aerosolen und Enzymsystemen *in vitro* wurde die Enzymaktivität von  $\alpha$ -Amylase und Protease ermittelt. Hierfür wurden biologische Suspensionen mit dem Liquid direkt oder in aerosolierter Form behandelt. Eine Änderung von Enzymaktivitäten deutet auf eine Störung von Schlüsselfaktoren für die Lebensfähigkeit und Gesundheit von Zellen in den meisten physiologischen Prozessen hin (187). Chronische Atemwegserkrankungen wie die Mucoviszidose, Asthma bronchiale und COPD werden mit einer Dysregulierung von Enzymen und der Überexpression von Mucinen assoziiert. Die Polysaccharide in den Mucinen haben eine Barrierefunktion gegenüber enzymatischem Abbau somit kann die Aktivitätsänderung von Enzymen korrelieren mit der Zu- oder Abnahme von Mucinen und der

Beeinträchtigung des mukoziliären Transportsystems. Das Bedampfen von biologischen Suspensionen führte bei niedriger Leistung der e-Zigarette (20 Watt) zu keiner bzw. einer leichten Änderung der Enzymaktivität. Die Anwendung einer hohen Leistung (80 Watt) bewirkte tendenziell das Herabsetzen der Enzymaktivitäten. Die Erhöhung der Enzymaktivitäten könnte zu einem enzymatischen Abbau von Schleimstoffen wie Mucinen führen, was wiederum die effektive, mechanische Abwehr gegenüber bakteriellen Infektionen zur Folge hätte (190). Der Weg von der Identifizierung wirksamer Aerosole bis zu ihrer Verwendung beim Menschen zur Behandlung von respiratorischen Krankheiten ist mehrstufig und umfasst pharmakologische (Konzentration des Wirkstoffs am Wirkort, Halbwertszeit, Serumspiegel, Dosis-Wirkungs-Beziehung usw.) und toxikologische (z. B. Toxizität, allergische Reaktionen und Wechselwirkungen) Aspekte. Die Applikation dieser Aerosole mithilfe einer neuen Technologie als *electronic drug delivery system* (EDDS) bedarf zusätzlichen Tests und der Anmeldung als Medizinprodukt. Es stellt sich jedoch aus Sicht der Produzenten von e-Zigaretten die Frage, ob dieses sehr aufwendige Verfahren und die Etablierung eines Qualitätsmanagementsystems wirtschaftlich in Kauf genommen wird, um den streng regulierten Arzneimittelmarkt zu durchdringen, wenn doch der Genussmittelmarkt sehr erfolgreich ist. Die Verpflichtungen gegenüber regelmäßigen Audits, der Pflege eines Vigilanzsystems, Qualifizierungen, Validierungen, klinischen Studien u.a. scheinen keinen Anreiz zu liefern im Vergleich zum verhältnismäßig einfachen Inverkehrbringen als *electronic nicotine delivery system* (ENDS). Andererseits führt das rasante Wachstum zu einer schwierigen Marktlage und harter Konkurrenz. Das Erschließen des pharmazeutischen Marktes mit einer neuen Technologie würde eine Marktnische schaffen und neue Perspektiven bieten. Eine mögliche, realisierbare Erweiterung könnte ein zeitpunktbasiertes elektronisches Controlling sein, welches über patientenindividuelle Einstellungen eine bestimmte Dosierung zu einem bestimmten Zeitpunkt ermöglicht und dieses über ein Warnsystem aufmerksam macht. Eine Sperrung des Systems für ungewünschte mehrfache Anwendungen würde sogar eine eltern- und arztüberwachte Applikation bei Kindern oder dementen Patienten möglich machen und somit Fehldosierungen entgegenwirken. Eine Füllstandskontrolle könnte ebenfalls zu einer Sperrung des Systems führen, sobald die Gleichförmigkeit des abgegebenen Gehaltes nicht mehr gewährleistet ist. Unter sicherheitstechnischen Aspekten wäre somit auch ein Schutz gegenüber Überhitzung gegeben. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Substanzen als Transportmittel verwendet, die bereits in kommerziellen Liquids angewendet werden. Die Verwendung einer Propylenglycol-Glycerin-Mischung als Vehikel scheint zwar unzureichend untersucht zu sein, jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass die Pyrolyse zu potentiell toxischen bzw. reizenden Substanzen stark von der Leistung der e-Zigarette und somit von der Temperatur der Heizwendel abhängt. Die pulmonale Anwendung von Glycerin und Propylenglycol als Hilfsstoff in zugelassenen Arzneimitteln ist bereits gegeben, jedoch werden diese Arzneimittel bei der Applikation thermisch nicht belastet. Die Bildung von Zersetzungsprodukten

(Carbonyl-Verbindungen) bei Temperaturen zwischen 200 und 300°C schränkt die Anwendung im niedrigeren Leistungsbereich von e-Zigaretten zwar ein, ist aber prinzipiell bei Gewährleistung von Sicherheitsaspekten möglich (141). Das Transportmittel macht den Wirkstoff erst applizierbar und optimal wirksam, wobei es selbst physiologisch gut verträglich und bis auf die beabsichtigte Funktion inert sein muss. Gleichzeitig sind Hilfsstoffe im Hinblick auf Qualität und Unbedenklichkeit den Wirkstoffen gleichwertig und unterliegen denselben Maßnahmen der Qualitätssicherung. Dieses trifft ebenfalls auf toxikologische Untersuchungen zu, auch wenn bei bekannten Hilfsstoffen aus Arzneibuchmonographien lediglich der Applikationsweg oder Verwendungszweck verändert wird. Es ist außerdem zu beachten, dass der Unterschied zwischen dem zeitlich regelmäßigen Gebrauch einer e-Zigarette zu Genusszwecken und dem definierten Anwenden eines Medizinproduktes zur Applikation eines Arzneimittels nach Gebrauchsanweisung enorm ist.

In den Untersuchungen der antibakteriellen Eigenschaften der Liquids bzw. Aerosole *in vitro* konnten antibakterielle Aktivitäten nachgewiesen werden. Dabei verstärkt die Zugabe eines Wirkstoffes zum Basisliquid die bereits antibakterielle Wirkung der Bestandteile Glycerin und Propylenglycol. Die hygroskopischen Eigenschaften dieser Substanzen sind für eine bessere Wirkung in aerosolierter Form verantwortlich. Sie entziehen die Feuchtigkeit aus der Luft und haben einen austrocknenden Effekt auf die Bakterien (223). Die möglichen negativen Auswirkungen der Hygroskopie der Vehikel im Wechselwirken mit der beschränkten Feuchtigkeit der Lunge müssen dabei weiter untersucht werden. Eine potentielle technologische Umsetzung muss ebenfalls die Bildung von Carbonyl-Verbindungen unterbinden. Das Bedampfen der Bakterienarten hatte einen antibakteriellen Effekt, der zeitlich abhängig war von der Leistung der e-Zigarette. Vor einem möglichen Einsatz müssen nicht-klinische Unbedenklichkeitsprüfungen die Substanzen zur Inhalation bewerten, um eine sichere Anwendung am Menschen zu gewährleisten. Potenzielle Wechselwirkungen zwischen Wirkstoff und Formulierung werden ebenfalls bewertet. Die Interpretation von pharmakologischen und toxikologischen Ergebnissen in dieser besonderen Kategorie der Inhalationspräparate umfasst dabei sowohl das Gerät als auch die Formulierung. Im Vergleich zu einer peroralen Applikation ist die Etablierung von Substanzklassen für die pulmonale Anwendung als Wirkstoff aber auch Hilfsstoff in der pharmazeutischen Industrie nicht ausreichend. Das Biopharmazeutische Klassifizierungssystem (*Biopharmaceutics Classification System*, BCS) unterteilt potentielle Wirkstoffe in Kategorien der oralen Bioverfügbarkeit. Ein derartiges System ist für die pulmonale Applikation nicht vorhanden, jedoch wird seit dem Jahr 2015 daran geforscht. Diese Datenbank soll in Zukunft Informationen zur pulmonalen Applikation, Lungenphysiologie, dem Verbleib von inhalierten Substanzen, der topischen Aerosoldeposition, makroskopischen Clearance-Mechanismen, Partikelauflösung und der Absorption von Substanzen beinhalten (33). Die Probleme und Nebenwirkungen der inhalativen Therapie, wie beispielsweise Hustenreize, Allergien, Verschlucken des Aerosols und histopathologische

Veränderungen müssen anschließend in klinischen Studien dokumentiert werden. Gegenwärtig sind klinische Studien bzw. Studien *in vivo* an Tieren mit inhalativen Arzneimitteln weitestgehend Pilotstudien zur Untersuchung der Wirksamkeit eines Wirkstoffs nach pulmonaler Verabreichung. Diese Studien prüfen Wirksamkeit oder Toxizität einer optimierten Formulierung, vergleichen jedoch nicht Formulierungseigenschaften. Ebenso sind Bioäquivalenzstudien aufgrund der vielen Variablen sehr komplex und nicht einfach zu praktizieren. Hier spielt allerdings auch die fehlende Harmonisierung von regulatorischen Richtlinien eine entscheidende Rolle. Die pulmonale Verabreichung von Arzneimitteln ist eines der ältesten Applikationswege mit vielen potentiellen Vorteilen. Eine gezielte inhalative Verabreichung ermöglicht hohe Arzneimittelkonzentrationen direkt am Wirkort. Eine niedrigere Dosierung kann dabei zu einer verstärkten Wirkung aufgrund der höheren Bioverfügbarkeit im Vergleich zur peroralen Applikation aufgrund des fehlenden *First-Pass*-Effektes führen. Es kommt ebenfalls zu minimalen systemischen Nebenwirkungen. Ungeachtet der drei zugelassenen medizinischen Inhalatoren, mangelt es an einer idealen technologischen Umsetzung. Ein idealer Inhalator muss zuverlässig und reproduzierbar die Gleichförmigkeit des abgegebenen Gehaltes gewährleisten. Die erzeugte Partikelgröße muss je nach beabsichtigtem Wirkort (MMAD 1 – 10 µm) angepasst sein. Eine einfache Anwendung und kleine Größe erhöhen die Patienten-Compliance erheblich, ebenso wie die Fähigkeit zur mehrfachen Dosierung und Kosteneffizienz aufgrund von austauschbaren Geräteteilen. Eine definierte Haltbarkeit und Robustheit gegenüber bakterieller Kontamination sind angestrebte Parameter, die eine hohe Stabilität ermöglichen (60). Die e-Zigarette wäre grundsätzlich in der Lage nach technischen Modifizierungen diese Eigenschaften erfüllen zu können. Inhalative Anwendungen werden perspektivisch wohl nicht zuletzt aufgrund der aktuellen COVID-19-Pandemie eine zunehmende Rolle spielen. Der Bedarf nach alternativen Therapieoptionen wird weiter ansteigen. Die Technologie der elektronischen Zigarette bietet mit ihren technischen Einstellungen und Möglichkeiten zur Modifizierung ein potentielles pulmonales Applikationssystem (EDDS) von inhalativen, thermisch stabilen Arzneimitteln in Form eines Medizinproduktes.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Forum of International Respiratory Societies. The Global Impact of Respiratory Disease 2021; 3:1–52 [Stand: 18.12.2021]. Verfügbar unter: [firsnet.org/images/publications/FIRS\\_Master\\_09202021.pdf](https://firsnet.org/images/publications/FIRS_Master_09202021.pdf).
2. Plaza V, Giner J, Rodrigo GJ, Dolovich MB, Sanchis J. Errors in the Use of Inhalers by Health Care Professionals: A Systematic Review. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2018; 6(3):987–95. doi: 10.1016/j.jaip.2017.12.032.
3. Global State of Tobacco Harm Reduction. *Burning Issues*. London: WC2N 5BY; 2020.
4. Stiftung Warentest. E-Zigarette - Ist Dampf weniger gefährlich als Rauchen?; 2021 [Stand: 07.08.2021]. Verfügbar unter: <https://www.test.de/E-Zigarette-Ist-Dampfen-weniger-gefaehrlich-als-Rauchen-4817257-0/>.
5. Thomas BF, Hrsg. Analytical Assessment of e-Cigarettes: From Contents to Chemical and Particle Exposure Profiles. Saint Louis: Elsevier Science; 2016. Verfügbar unter: <http://gbv.ebib.com/patron/FullRecord.aspx?p=4745405>.
6. Moon C, Smyth HDC, Watts AB, Williams RO. Delivery Technologies for Orally Inhaled Products: an Update. *AAPS PharmSciTech* 2019; 20(3):117. doi: 10.1208/s12249-019-1314-2.
7. Ferrari M, Zanasi A, Nardi E, Morselli Labate AM, Ceriana P, Balestrino A et al. Short-term effects of a nicotine-free e-cigarette compared to a traditional cigarette in smokers and non-smokers. *BMC Pulm Med* 2015; 15:120. doi: 10.1186/s12890-015-0106-z.
8. Varughese S, Teschke K, Brauer M, Chow Y, van Netten C, Kennedy SM. Effects of theatrical smokes and fogs on respiratory health in the entertainment industry. *Am J Ind Med* 2005; 47(5):411–8. doi: 10.1002/ajim.20151.
9. Bond JA. Metabolism and elimination of inhaled drugs and airborne chemicals from the lungs. *Pharmacol Toxicol* 1993; 72 Suppl 3:36–47. doi: 10.1111/j.1600-0773.1993.tb01699.x.
10. Spektrum Akademischer Verlag. Aerosole: Lexikon der Geographie; 2021 [Stand: 04.11.2021]. Verfügbar unter: <https://www.spektrum.de/lexikon/geographie/aerosole/135>.
11. Umweltbundesamt. Feinstaub; 2021 [Stand: 04.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.umweltbundesamt.de/themen/luft/luftschadstoffe-im-eberblick/feinstaub>
12. Lippold BC, Müller-Goymann C, Schubert R. Pharmazeutische Technologie: Mit Einführung in Biopharmazie und Biotechnologie. 10., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2017. Verfügbar unter: <https://elibrary.hirzel.de/textbook/99.105015/9783804734821>.
13. Sanders M. Inhalation therapy: an historical review. *Prim Care Respir J* 2007; 16(2):71–81. doi: 10.3132/pcrj.2007.00017.
14. Heubner W. Über Inhalation zerstäubter Flüssigkeiten 1919:1–64.
15. Stein SW, Thiel CG. The History of Therapeutic Aerosols: A Chronological Review. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2017; 30(1):20–41. doi: 10.1089/jamp.2016.1297.
16. Bisgaard H, O'Callaghan C, Smaldone GC. Drug Delivery to the Lung: Lung Biology in Health and Disease. New York: CRC Press/Taylor & Francis; 2001.
17. Rau JL. The Inhalation of Drugs: Advantages and Problems. *Respiratory Care* 2005; 50(3):367–82.
18. Silbernagl S, Despopoulos A. Taschenatlas der Physiologie. 5., komplett überarb. und neu gestaltete Aufl. Stuttgart, New York: Thieme; 2001. (Flexibles Taschenbuch).

19. Helmholtz Zentrum München, Deutsches Zentrum für Lungenforschung. Lungeninformationdienst; 2021 [Stand: 04.11.2021]. Verfügbar unter: <https://www.lungeninformationsdienst.de/index.html>.
20. Lammert E, Zeeb M. *Metabolism of Human Diseases*. Vienna: Springer Vienna; 2014.
21. Weibel ER, Gomez DM. Architecture of the human lung. Use of quantitative methods establishes fundamental relations between size and number of lung structures. *Science* 1962; 137(3530):577–85. doi: 10.1126/science.137.3530.577.
22. Schmidt RF, Thews G, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit 94 Tabellen*. 24., korr. Aufl. Berlin: Springer; 1990. (Springer-Lehrbuch).
23. Behrends JC, Bischofberger J, Deutzmann R, Ehmke H. *Physiologie*. 3., vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2017. (Thieme eRef). Verfügbar unter: <https://eref.thieme.de/ebooks/1502150>.
24. Oczenski W. *Atmen - Atemhilfen: Atemphysiologie und Beatmungstechnik*. 9., überarb. u. erw. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2012. (Thieme E-Book Kollektion Klinik & Praxis).
25. Thews O. Pulmonaler Gasaustausch und Arterialisierung. In: Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit 850 Farbabbildungen*. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer; 2019. S. 344–53 (Lehrbuch).
26. Hofmann W. Modelling inhaled particle deposition in the human lung—A review. *Journal of Aerosol Science* 2011; 42(10):693–724. doi: 10.1016/j.jaerosci.2011.05.007.
27. Rangaraj N, Pailla SR, Sampathi S. Insight into pulmonary drug delivery: Mechanism of drug deposition to device characterization and regulatory requirements. *Pulm Pharmacol Ther* 2019; 54:1–21. doi: 10.1016/j.pupt.2018.11.004.
28. FST GmbH - Filtrations-Separations-Technik. Partikel: Partikelkategorisierung; 2021 [Stand: 21.11.2021]. Verfügbar unter: <https://www.fstweb.de/de/wissen-tools/partikel/>.
29. Ruge CA, Kirch J, Lehr C-M. Pulmonary drug delivery: from generating aerosols to overcoming biological barriers—therapeutic possibilities and technological challenges. *The Lancet Respiratory Medicine* 2013; 1(5):402–13. doi: 10.1016/S2213-2600(13)70072-9.
30. Liang W, Pan HW, Vllasaliu D, Lam JKW. Pulmonary Delivery of Biological Drugs. *Pharmaceutics* 2020; 12(11). doi: 10.3390/pharmaceutics12111025.
31. Beaulac C, Sachtelli S, Lagacé J. Aerosolization of Low Phase Transition Temperature Liposomal Tobramycin as a Dry Powder in an Animal Model of Chronic Pulmonary Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Drug Targeting* 1999; 7(1):33–41.
32. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part I: physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(6):588–99. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x.
33. Sou T, Bergström CAS. Contemporary Formulation Development for Inhaled Pharmaceuticals. *J Pharm Sci* 2021; 110(1):66–86. doi: 10.1016/j.xphs.2020.09.006.
34. Pilcer G, Amighi K. Formulation strategy and use of excipients in pulmonary drug delivery. *Int J Pharm* 2010; 392(1-2):1–19. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.017.
35. Usmani OS, Biddiscombe MF, Barnes PJ. Regional lung deposition and bronchodilator response as a function of beta2-agonist particle size. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(12):1497–504. doi: 10.1164/rccm.200410-1414OC.
36. Barnes PJ. Distribution of receptor targets in the lung. *Proc Am Thorac Soc* 2004; 1(4):345–51. doi: 10.1513/pats.200409-045MS.

37. El Baou C, Di Santostefano RL, Alfonso-Cristancho R, Suarez EA, Stempel D, Everard ML et al. Effect of inhaled corticosteroid particle size on asthma efficacy and safety outcomes: a systematic literature review and meta-analysis. *BMC Pulm Med* 2017; 17(1):31. doi: 10.1186/s12890-016-0348-4.
38. Itzstein M von. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2007; 6(12):967–74. doi: 10.1038/nrd2400.
39. Dolovich MB, Dhand R. Aerosol drug delivery: developments in device design and clinical use. *The Lancet* 2011; 377(9770):1032–45. doi: 10.1016/S0140-6736(10)60926-9.
40. Mudge J. A Radical and Expeditious Cure for a Recent Catarrhus Cough. : Preceded By Some Observations on Respiration ; with Occasional and Practical Remarks on Some Other Diseases of the Lungs. London: E. Allen, Fleet-Street; 1778.
41. Anderson PJ. History of Aerosol Therapy: Liquid Nebulization to MDIs to DPIs. *Respiratory Care* 2005; 50(9):1139–50.
42. Robinson J. US1775947A - Electric Vaporizer - Patent; 1927. Verfügbar unter: <https://patents.google.com/patent/US1775947A/en>.
43. Ravichandiran V, Masilamani K, Satheshkumar S, Joseprakash D. Drug Delivery to the Lungs. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research* 2011; 10(2):85–9.
44. O'Callaghan O. Targeting drug delivery to the lungs by inhalation. *Mediators of Inflammation* 1994; (3):31–3.
45. Pothirat C, Chaiwong W, Phetsuk N, Pisalthanapuna S, Chetsadaphan N, Choomuang W. Evaluating inhaler use technique in COPD patients. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2015; 10:1291–8. doi: 10.2147/COPD.S85681.
46. van der Palen J, Klein JJ, Kerckhoff AH, van Herwaarden CL. Evaluation of the effectiveness of four different inhalers in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 1995; 50(11):1183–7. doi: 10.1136/thx.50.11.1183.
47. Bosnic-Anticevich SZ, Sinha H, So S, Reddel HK. Metered-dose inhaler technique: the effect of two educational interventions delivered in community pharmacy over time. *J Asthma* 2010; 47(3):251–6. doi: 10.3109/02770900903580843.
48. van Beerendonk I, Mesters I, Mudde AN, Tan TD. Assessment of the inhalation technique in outpatients with asthma or chronic obstructive pulmonary disease using a metered-dose inhaler or dry powder device. *J Asthma* 1998; 35(3):273–9. doi: 10.3109/02770909809068218.
49. Labiris NR, Dolovich MB. Pulmonary drug delivery. Part II: the role of inhalant delivery devices and drug formulations in therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol* 2003; 56(6):600–12. doi: 10.1046/j.1365-2125.2003.01893.x.
50. Holzner P. Aerosole. Applikationssysteme zur pulmonalen Anwendung von Arzneimitteln. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* 1997; 7(20):177–90.
51. Nerbrink O, Dahlbäck M, Hansson H-C. Why Do Medical Nebulizers Differ in Their Output and Particle Size Characteristics? *Journal of Aerosol Medicine* 1994; 7(3):259–76.
52. Cheng YS. Mechanisms of pharmaceutical aerosol deposition in the respiratory tract. *AAPS PharmSciTech* 2014; 15(3):630–40. doi: 10.1208/s12249-014-0092-0.
53. Balóira A, Abad A, Fuster A, García Rivero JL, García-Sidro P, Márquez-Martín E et al. Lung Deposition and Inspiratory Flow Rate in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Using Different Inhalation Devices: A Systematic Literature Review and Expert Opinion. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2021; 16:1021–33. doi: 10.2147/COPD.S297980.

54. Harrison MJ, McCarthy M, Fleming C, Hickey C, Shortt C, Eustace JA et al. Inhaled versus nebulised tobramycin: a real world comparison in adult cystic fibrosis (CF). *J Cyst Fibros* 2014; 13(6):692–8. doi: 10.1016/j.jcf.2014.04.004.
55. Newhouse MT, Hirst PH, Duddu SP, Walter YH, Tarara TE, Clark AR et al. Inhalation of a dry powder tobramycin PulmoSphere formulation in healthy volunteers. *Chest* 2003; 124(1):360–6. doi: 10.1378/chest.124.1.360.
56. Darquenne C. Aerosol deposition in health and disease. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* 2012; 25(3):140–7. doi: 10.1089/jamp.2011.0916.
57. Häkkinen AM, Uusi-Heikkilä H, Järvinen M, Saali K, Karhumäki L. The effect of breathing frequency on deposition of drug aerosol using an inhalation-synchronized dosimeter in healthy adults. *Clin Physiol* 1999; 19(3):269–74. doi: 10.1046/j.1365-2281.1999.00170.x.
58. Kim CS, Jaques PA. Analysis of Total Respiratory Deposition of Inhaled Ultrafine Particles in Adult Subjects at Various Breathing Patterns. *Aerosol Science and Technology* 2004; 38(6):525–40. doi: 10.1080/02786820490465513.
59. Horváth A, Balásházy I, Tomisa G, Farkas Á. Significance of breath-hold time in dry powder aerosol drug therapy of COPD patients. *Eur J Pharm Sci* 2017; 104:145–9. doi: 10.1016/j.ejps.2017.03.047.
60. Wolff RK, Niven RW. Generation of aerosolized drugs. *J Aerosol Med* 1994; 7(1):89–106. doi: 10.1089/jam.1994.7.89.
61. Gilbert HA. US3200819A - Smokeless non-tobacco cigarette - Patent; 1963 [Stand: 23.07.2021]. Verfügbar unter: <https://patents.google.com/patent/US3200819>.
62. Kraft T. So fing alles an: Die Geschichte der E-Zigarette; 2015 [Stand: 30.07.2021]. Verfügbar unter: <https://www.e-zigarette.de/tipps-und-tricks/die-geschichte-der-e-zigarette/>.
63. Lik H. US20060196518A1 - Flameless electronic atomizing cigarette - Patent; 2006. Verfügbar unter: <https://patents.google.com/patent/US20060196518A1/en>.
64. Ärzteblatt. E-Zigarette ist kein Medizinprodukt; 2013 [Stand: 30.07.2021]. Verfügbar unter: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/54752/E-Zigarette-ist-kein-Medizinprodukt>.
65. Bundesverwaltungsgericht. BVerwG 3 C 27.13 2014. Verfügbar unter: <https://www.bverwg.de/de/201114U3C27.13.0>.
66. Bundesverwaltungsgericht. BVerwG 3 C 25.13 2014. Verfügbar unter: <https://www.bverwg.de/201114U3C25.13.0>.
67. Bundesverwaltungsgericht. BVerwG 3 C 26.13 2014. Verfügbar unter: <https://www.bverwg.de/201114U3C26.13.0>.
68. Bundesgesetzblatt. Gesetz zum Schutz von Kindern und Jugendlichen vor den Gefahren des Konsums von elektronischen Zigaretten und elektronischen Shishas. *Bundesanzeiger* 2016; 2016:369–70.
69. Bundesministerium für Justiz, Bundesministerium für Verbraucherschutz. Gesetz über Tabakerzeugnisse und verwandte Erzeugnisse: Tabakerzeugnisgesetz - TabakerzG 2016:1–25.
70. Caponnetto P, Campagna D, Papale G, Russo C, Polosa R. The emerging phenomenon of electronic cigarettes. *Expert Rev Respir Med* 2012; 6(1):63–74. doi: 10.1586/ers.11.92.
71. Farsalinos KE, Spyrou A, Tsimopoulou K, Stefopoulos C, Romagna G, Voudris V. Nicotine absorption from electronic cigarette use: comparison between first and new-generation devices. *Sci Rep* 2014; 4:4133. doi: 10.1038/srep04133.
72. Dawkins L, Corcoran O. Acute electronic cigarette use: nicotine delivery and subjective effects in regular users. *Psychopharmacology (Berl)* 2014; 231(2):401–7. doi: 10.1007/s00213-013-3249-8.

73. Lopez AA, Hiler MM, Soule EK, Ramôa CP, Karaoghlanian NV, Lipato T et al. Effects of Electronic Cigarette Liquid Nicotine Concentration on Plasma Nicotine and Puff Topography in Tobacco Cigarette Smokers: A Preliminary Report. *Nicotine Tob Res* 2016; 18(5):720–3. doi: 10.1093/ntr/ntv182.
74. Farsalinos KE, Polosa R. Safety evaluation and risk assessment of electronic cigarettes as tobacco cigarette substitutes: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf* 2014; 5(2):67–86. doi: 10.1177/2042098614524430.
75. Farsalinos KE. Introduction to e-Cigarettes. In: Thomas BF, Hrsg. *Analytical Assessment of e-Cigarettes: From Contents to Chemical and Particle Exposure Profiles*. Saint Louis: Elsevier Science; 2016. S. 1–8.
76. Spanier T. E-cigarette/Vaping Q&A; 2022 [Stand: 15.01.2022]. Verfügbar unter: <https://www.allegropediatrics.com/blog/blog/from-our-docs/e-cigarette-qanda-with-dr-spanier>.
77. aspire-shop.de. eZigaretten und Zubehör: Verdampfer Cleito Aspire; 2021 [Stand: 01.10.2021]. Verfügbar unter: <https://aspire-shop.de/verdampfer/aspire/cleito>.
78. Sundahl M, Berg E, Svensson M. Aerodynamic particle size distribution and dynamic properties in aerosols from electronic cigarettes. *Journal of Aerosol Science* 2017; 103:141–50. doi: 10.1016/j.jaerosci.2016.10.009.
79. Son Y, Mainelis G, Delnevo C, Wackowski OA, Schwander S, Meng Q. Investigating E-Cigarette Particle Emissions and Human Airway Depositions under Various E-Cigarette-Use Conditions. *Chem Res Toxicol* 2020; 33(2):343–52. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00243.
80. Ingebrethsen BJ, Cole SK, Alderman SL. Electronic cigarette aerosol particle size distribution measurements. *Inhal Toxicol* 2012; 24(14):976–84. doi: 10.3109/08958378.2012.744781.
81. Mulder HA, Patterson JL, Halquist MS, Kosmider L, Turner JBM, Poklis JL et al. The Effect of Electronic Cigarette User Modifications and E-liquid Adulteration on the Particle Size Profile of an Aerosolized Product. *Sci Rep* 2019; 9(1):10221. doi: 10.1038/s41598-019-46387-2.
82. Zervas E, Litsiou E, Konstantopoulos K, Pouloupoulos S, Katsaounou P. Physical characterization of the aerosol of an electronic cigarette: impact of refill liquids. *Inhal Toxicol* 2018; 30(6):218–23. doi: 10.1080/08958378.2018.1500662.
83. Cooperation Centre for Scientific Research Relative to Tobacco. Routine analytical machine for e-cigarette aerosol generation and collection - definitions and standard conditions 2015.
84. Hutzler C, Paschke M, Kruschinski S, Henkler F, Hahn J, Luch A. Chemical hazards present in liquids and vapors of electronic cigarettes. *Arch Toxicol* 2014; 88(7):1295–308. doi: 10.1007/s00204-014-1294-7.
85. Cancelada L, Tang X, Russell ML, Maddalena RL, Litter MI, Gundel LA et al. Volatile aldehyde emissions from "sub-ohm" vaping devices. *Environ Res* 2021; 197:111188. doi: 10.1016/j.envres.2021.111188.
86. Noël A, Hossain E, Perveen Z, Zaman H, Penn AL. Sub-ohm vaping increases the levels of carbonyls, is cytotoxic, and alters gene expression in human bronchial epithelial cells exposed at the air-liquid interface. *Respir Res* 2020; 21(1):305. doi: 10.1186/s12931-020-01571-1.
87. Ganguly K, Nordström A, Thimraj TA, Rahman M, Ramström M, Sompa SI et al. Addressing the challenges of E-cigarette safety profiling by assessment of pulmonary toxicological response in bronchial and alveolar mucosa models. *Sci Rep* 2020; 10(1):20460. doi: 10.1038/s41598-020-77452-w.
88. Geiss O, Bianchi I, Barrero-Moreno J. Correlation of volatile carbonyl yields emitted by e-cigarettes with the temperature of the heating coil and the perceived sensorial quality of the generated vapours. *Int J Hyg Environ Health* 2016; 219(3):268–77. doi: 10.1016/j.ijheh.2016.01.004.

89. Chen W, Wang P, Ito K, Fowles J, Shusterman D, Jaques PA et al. Measurement of heating coil temperature for e-cigarettes with a "top-coil" clearomizer. *PLoS One* 2018; 13(4):e0195925. doi: 10.1371/journal.pone.0195925.
90. Kosmider L, Sobczak A, Fik M, Knysak J, Zacierka M, Kurek J et al. Carbonyl compounds in electronic cigarette vapors: effects of nicotine solvent and battery output voltage. *Nicotine Tob Res* 2014; 16(10):1319–26. doi: 10.1093/ntr/ntu078.
91. Zelinkova Z, Wenzl T. Influence of battery power setting on carbonyl emissions from electronic cigarettes. *Tob Induc Dis* 2020; 18:77. doi: 10.18332/tid/126406.
92. Uchiyama S, Noguchi M, Sato A, Ishitsuka M, Inaba Y, Kunugita N. Determination of Thermal Decomposition Products Generated from E-Cigarettes. *Chem Res Toxicol* 2020; 33(2):576–83. doi: 10.1021/acs.chemrestox.9b00410.
93. Ooi BG, Dutta D, Kazipeta K, Chong NS. Influence of the E-Cigarette Emission Profile by the Ratio of Glycerol to Propylene Glycol in E-Liquid Composition. *ACS Omega* 2019; 4(8):13338–48. doi: 10.1021/acsomega.9b01504.
94. Jaegers NR, Hu W, Weber TJ, Hu JZ. Low-temperature (< 200 °C) degradation of electronic nicotine delivery system liquids generates toxic aldehydes. *Sci Rep* 2021; 11(1):7800. doi: 10.1038/s41598-021-87044-x.
95. Son Y, Weisel C, Wackowski O, Schwander S, Delnevo C, Meng Q. The Impact of Device Settings, Use Patterns, and Flavorings on Carbonyl Emissions from Electronic Cigarettes. *Int J Environ Res Public Health* 2020; 17(16). doi: 10.3390/ijerph17165650.
96. Bitzer ZT, Goel R, Reilly SM, Foulds J, Muscat J, Elias RJ et al. Effects of Solvent and Temperature on Free Radical Formation in Electronic Cigarette Aerosols. *Chem Res Toxicol* 2018; 31(1):4–12. doi: 10.1021/acs.chemrestox.7b00116.
97. Jin L, Lynch J, Richardson A, Lorkiewicz P, Srivastava S, Theis W et al. Electronic cigarette solvents, pulmonary irritation, and endothelial dysfunction: role of acetaldehyde and formaldehyde. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2021; 320(4):H1510-H1525. doi: 10.1152/ajpheart.00878.2020.
98. Cossio R, Cerra ZA, Tanaka H. Vascular effects of a single bout of electronic cigarette use. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2020; 47(1):3–6. doi: 10.1111/1440-1681.13180.
99. Chaumont M, Becker B de, Zaher W, Culié A, Deprez G, Mélot C et al. Differential Effects of E-Cigarette on Microvascular Endothelial Function, Arterial Stiffness and Oxidative Stress: A Randomized Crossover Trial. *Sci Rep* 2018; 8(1):10378. doi: 10.1038/s41598-018-28723-0.
100. Ween MP, Whittall JJ, Hamon R, Reynolds PN, Hodge SJ. Phagocytosis and Inflammation: Exploring the effects of the components of E-cigarette vapor on macrophages. *Physiol Rep* 2017; 5(16). doi: 10.14814/phy2.13370.
101. Neu HM, Lee A, Brandis JEP, Patel V, Schneider A, Kane MA et al. Cigalike electronic nicotine delivery systems e-liquids contain variable levels of metals. *Sci Rep* 2020; 10(1):11907. doi: 10.1038/s41598-020-67789-7.
102. Hess CA, Olmedo P, Navas-Acien A, Goessler W, Cohen JE, Rule AM. E-cigarettes as a source of toxic and potentially carcinogenic metals. *Environ Res* 2017; 152:221–5. doi: 10.1016/j.envres.2016.09.026.
103. Gray N, Halstead M, Valentin-Blasini L, Watson C, Pappas RS. Toxic Metals in Liquid and Aerosol from Pod-Type Electronic Cigarettes. *J Anal Toxicol* 2020:1–7. doi: 10.1093/jat/bkaa185.
104. Olmedo P, Goessler W, Tanda S, Grau-Perez M, Jarmul S, Aherrera A et al. Metal Concentrations in e-Cigarette Liquid and Aerosol Samples: The Contribution of Metallic Coils. *Environ Health Perspect* 2018; 126(2):1–11. doi: 10.1289/EHP2175.

105. Williams M, Bozhilov K, Ghai S, Talbot P. Elements including metals in the atomizer and aerosol of disposable electronic cigarettes and electronic hookahs. *PLoS One* 2017; 12(4):1-24. doi: 10.1371/journal.pone.0175430.
106. Behar RZ, Luo W, McWhirter KJ, Pankow JF, Talbot P. Analytical and toxicological evaluation of flavor chemicals in electronic cigarette refill fluids. *Sci Rep* 2018; 8(1):8288. doi: 10.1038/s41598-018-25575-6.
107. Gerloff J, Sundar IK, Freter R, Sekera ER, Friedman AE, Robinson R et al. Inflammatory Response and Barrier Dysfunction by Different e-Cigarette Flavoring Chemicals Identified by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in e-Liquids and e-Vapors on Human Lung Epithelial Cells and Fibroblasts. *Appl In Vitro Toxicol* 2017; 3(1):28–40. doi: 10.1089/aivt.2016.0030.
108. Munakata S, Ishimori K, Kitamura N, Ishikawa S, Takanami Y, Ito S. Oxidative stress responses in human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke and vapor from tobacco- and nicotine-containing products. *Regul Toxicol Pharmacol* 2018; 99:122–8. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.09.009.
109. Muthumalage T, Prinz M, Ansah KO, Gerloff J, Sundar IK, Rahman I. Inflammatory and Oxidative Responses Induced by Exposure to Commonly Used e-Cigarette Flavoring Chemicals and Flavored e-Liquids without Nicotine. *Front Physiol* 2017; 8:1130. doi: 10.3389/fphys.2017.01130.
110. Sun Y-W, Chen K-M, Atkins H, Aliaga C, Gordon T, Guttenplan JB et al. Effects of E-Cigarette Aerosols with Varying Levels of Nicotine on Biomarkers of Oxidative Stress and Inflammation in Mice. *Chem Res Toxicol* 2021; 34(4):1161–8. doi: 10.1021/acs.chemrestox.1c00033.
111. Leigh NJ, Lawton RI, Hershberger PA, Goniewicz ML. Flavours significantly affect inhalation toxicity of aerosol generated from electronic nicotine delivery systems (ENDS). *Tob Control* 2016; 25(Suppl 2):ii81-ii87. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2016-053205.
112. Protano C, Avino P, Manigrasso M, Vivaldi V, Perna F, Valeriani F et al. Environmental Electronic Vape Exposure from Four Different Generations of Electronic Cigarettes: Airborne Particulate Matter Levels. *Int J Environ Res Public Health* 2018; 15(10). doi: 10.3390/ijerph15102172.
113. Visser WF, Klerx WN, Cremers HWJM, Ramlal R, Schwillens PL, Talhout R. The Health Risks of Electronic Cigarette Use to Bystanders. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(9). doi: 10.3390/ijerph16091525.
114. Glasser AM, Collins L, Pearson JL, Abudayyeh H, Niaura RS, Abrams DB et al. Overview of Electronic Nicotine Delivery Systems: A Systematic Review. *Am J Prev Med* 2017; 52(2):e33-e66. doi: 10.1016/j.amepre.2016.10.036.
115. Public Health England. E-cigarettes: an evidence update: A report commissioned by Public Health England 2015:1–113.
116. Hartmann-Boyce J, McRobbie H, Lindson N, Bullen C, Begh R, Theodoulou A et al. Electronic cigarettes for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 10:CD010216. doi: 10.1002/14651858.CD010216.pub4.
117. Bundesgesundheitsministerium, Hrsg. Medizinproduktegesetz; 1995. Verfügbar unter: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/themen/gesundheitswesen/medizinprodukte/definition-und-wirtschaftliche-bedeutung.html>.
118. Rat der Europäischen Gemeinschaften, Hrsg. Richtlinie 90/385/EWG: Aktive Implantate; 1993.
119. Rat der Europäischen Gemeinschaften, Hrsg. Richtlinie 93/42/EWG: Medizinprodukte; 1993.
120. Rudl-Truxa E. E-Zigarette als Applikatoren für Arzneimittel: Beurteilung einer Fachanwältin für Medizinrecht. Neumüller & Partner GbR 2019.

121. Bauer C, Kreuter M, Herth F. Übersicht – Die E-Zigarette in der Tabakentwöhnung. *TumorDiagn u Ther* 2016; 37(02):69–72. doi: 10.1055/s-0042-100293.
122. Başer KHC, Buchbauer G. *Handbook of essential oils: Science, technology, and applications*. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis; 2010.
123. Lindmark-Henriksson M, Hrsg. *Biotransformation of Turpentine Constituents: Oxygenation and Esterification*; 2003.
124. Internationale Organisation für Normung. ISO 9235:2021-06 Natürliche aromatische Rohstoffe - Vokabular; 2021 [Stand: 23.10.2021]. Verfügbar unter: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:9235:ed-2:v1:de>.
125. Pharmacopoea Europaea. *Europäisches Arzneibuch 10.2 - Amtliche deutsche Ausgabe: Deutscher Apotheker Verlag*; 2021.
126. Schilcher H, Fischer M, Frank B, Kammerer S, Wegener T, Hrsg. *Leitfaden Phytotherapie*. 5. Auflage. München: Elsevier Urban & Fischer; 2016. Verfügbar unter: <http://www.elsevier.de/978-3-437-55344-8>.
127. Plumlee KH, Hrsg. *Clinical veterinary toxicology*. St. Louis, Mo: Mosby; 2004. Verfügbar unter: <https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&scope=site&db=nlebk&db=nlabk&AN=448367>.
128. Hänsel R, Sticher O, Hrsg. *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9. Aufl. 2010. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2009. (Springer-Lehrbuch). Verfügbar unter: <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1530275>.
129. Behrendt H-J, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 2004; 141(4):737–45. doi: 10.1038/sj.bjp.0705652.
130. Hasani A, Pavia D, Toms N, Dilworth P, Agnew JE. Effect of aromatics on lung mucociliary clearance in patients with chronic airways obstruction. *J Altern Complement Med* 2003; 9(2):243–9. doi: 10.1089/10755530360623356.
131. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(6):2474–8. doi: 10.1128/AAC.49.6.2474-2478.2005.
132. Mohammadi Nejad S, Özgüneş H, Başaran N. Pharmacological and Toxicological Properties of Eugenol. *Turk J Pharm Sci* 2017; 14(2):201–6. doi: 10.4274/tjps.62207.
133. Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 2007; 55(12):4863–70. doi: 10.1021/jf0636465.
134. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Front Microbiol* 2012; 3:12. doi: 10.3389/fmicb.2012.00012.
135. Marchese A, Barbieri R, Coppo E, Orhan IE, Daglia M, Nabavi SF et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Crit Rev Microbiol* 2017; 43(6):668–89. doi: 10.1080/1040841X.2017.1295225.
136. Teuscher E, Melzig MF, Lindequist U. *Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der pharmazeutischen Biologie*. 7., neu bearbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2012.

137. Raharjo TJ, Chang W-T, Verberne MC, Peltenburg-Looman AMG, Linthorst HJM, Verpoorte R. Cloning and over-expression of a cDNA encoding a polyketide synthase from *Cannabis sativa*. *Plant Physiol Biochem* 2004; 42(4):291–7. doi: 10.1016/j.plaphy.2004.02.011.
138. Gülck T, Møller BL. Phytocannabinoids: Origins and Biosynthesis. *Trends Plant Sci* 2020; 25(10):985–1004. doi: 10.1016/j.tplants.2020.05.005.
139. Fraguas-Sánchez AI, Torres-Suárez AI. Medical Use of Cannabinoids. *Drugs* 2018; 78(16):1665–703. doi: 10.1007/s40265-018-0996-1.
140. Vučković S, Srebro D, Vujović KS, Vučetić Č, Prostran M. Cannabinoids and Pain: New Insights From Old Molecules. *Front Pharmacol* 2018; 9:1–19. doi: 10.3389/fphar.2018.01259.
141. Wang J, Wang Y, Tong M, Pan H, Da Li. Medical Cannabinoids for Cancer Cachexia: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biomed Res Int* 2019; 2019:2864384. doi: 10.1155/2019/2864384.
142. Tura M, Mandrioli M, Gallina Toschi T. Preliminary Study: Comparison of Antioxidant Activity of Cannabidiol (CBD) and  $\alpha$ -Tocopherol Added to Refined Olive and Sunflower Oils. *Molecules* 2019; 24(19). doi: 10.3390/molecules24193485.
143. Russo E, Guy GW. A tale of two cannabinoids: the therapeutic rationale for combining tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Med Hypotheses* 2006; 66(2):234–46. doi: 10.1016/j.mehy.2005.08.026.
144. Bulitta JB, Ly NS, Landersdorfer CB, Wanigaratne NA, Velkov T, Yadav R et al. Two mechanisms of killing of *Pseudomonas aeruginosa* by tobramycin assessed at multiple inocula via mechanism-based modeling. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(4):2315–27. doi: 10.1128/AAC.04099-14.
145. Hancock RE, Raffle VJ, Nicas TI. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1981; 19(5):777–85. doi: 10.1128/AAC.19.5.777.
146. Habermehl G, Hammann PE, Krebs HC, Ternes W. *Naturstoffchemie: Eine Einführung*. 3., vollständig überarbeitete und erweiterte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2008.
147. McEvoy G. AHFS drug information® (2016). Bethesda Md: American Society of Health-System Pharmacists; 2015. Verfügbar unter: <http://worldcatlibraries.org/wcpa/oclc/937406549>.
148. U.S. Food and Drug Administration. Generally Recognized as Safe (GRAS); 2019. Verfügbar unter: <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>.
149. Brisson D, Vohl MC, St-Pierre J, Hudson TJ, Gaudet D. Glycerol: a neglected variable in metabolic processes? *Bioessays* 2001; 23(6):534–42. doi: 10.1002/bies.1073.
150. GESTIS-Stoffdatenbank. Glycerin - Propylenglycol; 2021 [Stand: 21.11.2021]. Verfügbar unter: <https://gestis.dguv.de/>.
151. U.S. National Library of Medicine. Glycerin: U.S. National Library of Medicine; 2021 [Stand: 07.11.2021]. Verfügbar unter: <https://chem.nlm.nih.gov/chemidplus/rn/56-81-5>.
152. Phillips B, Titz B, Kogel U, Sharma D, Leroy P, Xiang Y et al. Toxicity of the main electronic cigarette components, propylene glycol, glycerin, and nicotine, in Sprague-Dawley rats in a 90-day OECD inhalation study complemented by molecular endpoints. *Food Chem Toxicol* 2017; 109(Pt 1):315–32. doi: 10.1016/j.fct.2017.09.001.
153. Renne RA, Wehner AP, Greenspan BJ, Deford HS, Ragan HA, Westerberg RB et al. 2-Week and 13-Week Inhalation Studies of Aerosolized Glycerol in Rats. *Inhal Toxicol* 1992; 4(2):95–111. doi: 10.3109/08958379209145307.

- 154.ABDA. Gelbe Liste: Verschreibungspflicht von Arzneimitteln und Erstattungsfähigkeit durch die Gesetzliche Krankenversicherung. Eschborn: Govi (Imprint) in der Avoxa - Mediengruppe Deutscher Apotheker GmbH; Govi-Verlag Pharmazeutischer Verlag.
- 155.Bundesinstitut für Risikobewertung. Liquids von E-Zigaretten können die Gesundheit beeinträchtigen: Stellungnahme Nr. 016/2012 des BfR vom 24. Februar 2012, ergänzt am 21. Januar 2013 2013:1–11.
- 156.Ruddick JA. Toxicology, metabolism, and biochemistry of 1,2-propanediol. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1972; 21(1):102–11. doi: 10.1016/0041-008X(72)90032-4.
- 157.LaKind JS, McKenna EA, Hubner RP, Tardiff RG. A review of the comparative mammalian toxicity of ethylene glycol and propylene glycol. *Crit Rev Toxicol* 1999; 29(4):331–65. doi: 10.1080/10408449991349230.
- 158.Robertson OH, Loosli CG. Tests for the chronic toxicity of propylene glycol and triethylene glycol on monkeys and rats by vapor inhalation and oral administration. *J Pharmacol Exp Ther* 1947; 91(1):52–76.
- 159.Deutsches Arzneibuch. DAB 2020: Deutscher Apotheker Verlag; 2020.
- 160.Steamo GmbH. Museum e-Zigarette: Cuboid Mini; 2022 [Stand: 22.03.2022]. Verfügbar unter: <https://www.steamo.de/museum-e-zigarette/cuboid-mini.html?language=de>.
- 161.Internationale Organisation für Normung. ISO/TR 19478-2:2015(en), ISO and Health Canada intense smoking parameters: Part 2: Examination of factors contributing to variability in the routine measurement of TPM, water and NFDPM smoke yields of cigarettes; 2015 [Stand: 23.07.2021]. Verfügbar unter: <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:tr:19478:-2:ed-1:v1:en>.
- 162.Cammann K, Hrsg. Instrumentelle analytische Chemie: Verfahren, Anwendungen und Qualitätssicherung. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2001. (Spektrum Lehrbuch).
- 163.Kromidas S, Kuss H-J. Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC. Weinheim: WILEY-VCH; 2008.
- 164.Garrett DA, Failla ML, Sarama RJ. Development of an in vitro digestion method to assess carotenoid bioavailability from meals. *J Agric Food Chem* 1999; 47(10):4301–9. doi: 10.1021/jf9903298.
- 165.Miller DD, Schricker BR, Rasmussen RR, van Campen D. An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American journal of clinical nutrition* 1981; 34(10):2248–56. Verfügbar unter: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6794346/>.
- 166.Werner S, Böhm V. Bioaccessibility of carotenoids and vitamin e from pasta: evaluation of an in vitro digestion model. *J Agric Food Chem* 2011; 59(4):1163–70. doi: 10.1021/jf103892y.
- 167.Bernfeld P. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem* 1951; 12:379–428. doi: 10.1002/9780470122570.ch7.
- 168.171(2):501–5. doi: 10.1016/S0021-9258(17)41059-3.
- 169.Clinical and Laboratory Standards Institute. Guidelines; 2021 [Stand: 01.10.2021]. Verfügbar unter: <https://clsi.org/>.
- 170.Rossolini GM, Mantengoli E. Treatment and control of severe infections caused by multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11 Suppl 4:17–32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2005.01161.x.
- 171.de Chang, Sharma L, Dela Cruz CS, Zhang D. Clinical Epidemiology, Risk Factors, and Control Strategies of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Front Microbiol* 2021; 12:750662. doi: 10.3389/fmicb.2021.750662.

172. Algammal AM, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah DHH, Hozzein WN, Batiha GE-S et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect Drug Resist* 2020; 13:3255–65. doi: 10.2147/IDR.S272733.
173. Cools F, Delputte P, Cos P. The search for novel treatment strategies for *Streptococcus pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2021; 45(4). doi: 10.1093/femsre/fuaa072.
174. Riesbeck K. Complement evasion by the human respiratory tract pathogens *Haemophilus influenzae* and *Moraxella catarrhalis*. *FEBS Lett* 2020; 594(16):2586–97. doi: 10.1002/1873-3468.13758.
175. Hahn H, Klein P, Vogt K, Hrsg. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie: Mit 155 Tabellen*. 5., vollst. aktualisierte Aufl. Heidelberg: Springer; 2005.
176. Maruzzella JC, Sicurella NA. Antibacterial Activity of Essential Oil Vapors. *Journal of the American Pharmaceutical Association (Scientific ed.)* 1960; 49(11):692–4. doi: 10.1002/jps.3030491103.
177. Inouye S, Uchida K, Yamaguchi H. In-vitro and in-vivo anti-Trichophyton activity of essential oils by vapour contact. *Mycoses* 2001; 44(3-4):99–107. doi: 10.1046/j.1439-0507.2001.00618.x.
178. Hoskovec M, Grygarová D, Cvaeka J, Streinz L, Zima J, Verevkin SP et al. Determining the vapour pressures of plant volatiles from gas chromatographic retention data. *J Chromatogr A* 2005; 1083(1-2):161–72. doi: 10.1016/j.chroma.2005.06.006.
179. van Roon A, Parsons JR, Govers HA. Gas chromatographic determination of vapour pressure and related thermodynamic properties of monoterpenes and biogenically related compounds. *Journal of Chromatography A* 2002; 955(1):105–15. doi: 10.1016/S0021-9673(02)00200-5.
180. Soulet S, Duquesne M, Toutain J, Pairaud C, Mercury M. Impact of Vaping Regimens on Electronic Cigarette Efficiency. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(23). doi: 10.3390/ijerph16234753.
181. Soulet S, Pairaud C, Lalo H. A Novel Vaping Machine Dedicated to Fully Controlling the Generation of E-Cigarette Emissions. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14(10). doi: 10.3390/ijerph14101225.
182. Filer CN. Acidic Cannabinoid Decarboxylation. *Cannabis Cannabinoid Res* 2021. doi: 10.1089/can.2021.0072.
183. Wu J, Yang M, Huang J, Gao Y, Li D, Gao N. Vaporization characteristics and aerosol optical properties of electronic cigarettes. *Environ Pollut* 2021; 275:116670. doi: 10.1016/j.envpol.2021.116670.
184. Lee Y-J, Na C-J, Botao L, Kim K-H, Son Y-S. Quantitative insights into major constituents contained in or released by electronic cigarettes: Propylene glycol, vegetable glycerin, and nicotine. *Sci Total Environ* 2020; 703:134567. doi: 10.1016/j.scitotenv.2019.134567.
185. Farsalinos KE, Yannovits N, Sarri T, Voudris V, Poulas K. Nicotine Delivery to the Aerosol of a Heat-Not-Burn Tobacco Product: Comparison With a Tobacco Cigarette and E-Cigarettes. *Nicotine Tob Res* 2018; 20(8):1004–9. doi: 10.1093/ntr/ntx138.
186. Dai J, Kim K-H, Szulejko JE, Jo S-H, Kwon K, Choi DW. Quantification of nicotine and major solvents in retail electronic cigarette fluids and vaped aerosols. *Microchemical Journal* 2018; 140:262–8. doi: 10.1016/j.microc.2018.04.028.
187. Meyer M, Jaspers I. Respiratory protease/antiprotease balance determines susceptibility to viral infection and can be modified by nutritional antioxidants. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2015; 308(12):L1189-201. doi: 10.1152/ajplung.00028.2015.

188. Martin SL, Reihill JA. Promotion of a Protease-Antiprotease Imbalance in the Airways through Chronic Vaping. *Am J Respir Crit Care Med* 2019; 200(11):1337–9. doi: 10.1164/rccm.201908-1605ED.
189. Cichońska D, Kusiak A, Kochańska B, Ochocińska J, Świetlik D. Influence of Electronic Cigarettes on Selected Antibacterial Properties of Saliva. *Int J Environ Res Public Health* 2019; 16(22). doi: 10.3390/ijerph16224433.
190. Slomiany BL, Murty V, Piotrowski J, Slomiany A. Salivary mucins in oral mucosal defense. *General Pharmacology: The Vascular System* 1996; 27(5):761–71. doi: 10.1016/0306-3623(95)02050-0.
191. Piotrowski J, Czajkowski A, Slomiany A, Shovlin FE, Murty VL, Slomiany BL. Expression of salivary mucin bacterial aggregating activity: difference with caries. *Biochem Int* 1992; 28(6):1021–8.
192. Capetti F, Cagliero C, Marengo A, Bicchi C, Rubiolo P, Sgorbini B. Bio-Guided Fractionation Driven by In Vitro  $\alpha$ -Amylase Inhibition Assays of Essential Oils Bearing Specialized Metabolites with Potential Hypoglycemic Activity. *Plants (Basel)* 2020; 9(9). doi: 10.3390/plants9091242.
193. Dey B, Mitra A, Katakam P, Singla RK. Exploration of natural enzyme inhibitors with hypoglycemic potentials amongst Eucalyptus Spp. by in vitro assays. *World J Diabetes* 2014; 5(2):209–18. doi: 10.4239/wjd.v5.i2.209.
194. Jelenkovic L, Jovanovic VS, Palic I, Mitic V, Radulovic M. In Vitro Screening of  $\alpha$ -Amylase Inhibition by Selected Terpenes from Essential Oils. *Trop. J. Pharm Res* 2014; 13(9):1421. doi: 10.4314/tjpr.v13i9.7.
195. Adefegha SA, Oboh G, Oyeleye SI, Osunmo K. Alteration of starch hydrolyzing enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phenolic profile of clove buds (*Syzygium aromaticum* L.) by cooking duration. *Food Sci Nutr* 2016; 4(2):250–60. doi: 10.1002/fsn3.284.
196. Sellami M, Louati H, Kamoun J, Kchaou A, Damak M, Gargouri Y. Inhibition of pancreatic lipase and amylase by extracts of different spices and plants. *Int J Food Sci Nutr* 2017; 68(3):313–20. doi: 10.1080/09637486.2016.1237479.
197. Bozier J, Chivers EK, Chapman DG, Larcombe AN, Bastian NA, Masso-Silva JA et al. The Evolving Landscape of e-Cigarettes: A Systematic Review of Recent Evidence. *Chest* 2020; 157(5):1362–90. Verfügbar unter: [https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692\(20\)30134-3/fulltext](https://journal.chestnet.org/article/S0012-3692(20)30134-3/fulltext).
198. Ghosh A, Coakley RC, Mascenik T, Rowell TR, Davis ES, Rogers K et al. Chronic E-Cigarette Exposure Alters the Human Bronchial Epithelial Proteome. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198(1):67–76. doi: 10.1164/rccm.201710-2033OC.
199. Alexander DJ, Collins CJ, Coombs DW, Gilkison IS, Hardy CJ, Healey G et al. Association of Inhalation Toxicologists (AIT) working party recommendation for standard delivered dose calculation and expression in non-clinical aerosol inhalation toxicology studies with pharmaceuticals. *Inhal Toxicol* 2008; 20(13):1179–89. doi: 10.1080/08958370802207318.
200. Song S-Y, Na HG, Kwak SY, Choi YS, Bae CH, Kim Y-D. Changes in Mucin Production in Human Airway Epithelial Cells After Exposure to Electronic Cigarette Vapor With or Without Nicotine. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 2021; 14(3):303–11. doi: 10.21053/ceo.2020.01907.
201. Gellatly S, Pavelka N, Crue T, Schweitzer KS, Day BJ, Min E et al. Nicotine-Free e-Cigarette Vapor Exposure Stimulates IL6 and Mucin Production in Human Primary Small Airway Epithelial Cells. *J Inflamm Res* 2020; 13:175–85. doi: 10.2147/JIR.S244434.
202. Garcia-Arcos I, Geraghty P, Baumlin N, Campos M, Dabo AJ, Jundi B et al. Chronic electronic cigarette exposure in mice induces features of COPD in a nicotine-dependent manner. *Thorax* 2016; 71(12):1119–29. doi: 10.1136/thoraxjnl-2015-208039.

203. Woolfrey BF, Fox JM, Quall CO. An analysis of error rates for disc agar-diffusion testing of *Pseudomonas aeruginosa* versus aminoglycosides. *American Society of Clinical Pathologists* 1981;559–64.
204. European Committee on Antimicrobial susceptibility Testing. EUCAST; 2021 [Stand: 23.10.2021]. Verfügbar unter: <https://eucast.org/>.
205. Fuochi V, Caruso M, Emma R, Stivala A, Polosa R, Distefano A et al. Investigation on the Antibacterial Activity of Electronic Cigarette Liquids (ECLs): A Proof of Concept Study. *Curr Pharm Biotechnol* 2021; 22(7):983–94. doi: 10.2174/1389201021666200903121624.
206. Khanam S, Guragain M, Lenaburg DL, Kubat R, Patrauchan MA. Calcium induces tobramycin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* by regulating RND efflux pumps. *Cell Calcium* 2017; 61:32–43. doi: 10.1016/j.ceca.2016.11.004.
207. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological Reviews* 1985; 49(1):1–32. doi: 10.1128/MMBR.49.1.1-32.1985.
208. Nostro A, Germanò MP, D'angelo V, Marino A, Cannatelli MA. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 2000; 30(5):379–84. doi: 10.1046/j.1472-765x.2000.00731.x.
209. Helander IM, Alakomi H-L, Latva-Kala K, Mattila-Sandholm T, Pol I, Smid EJ et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. *J. Agric. Food Chem.* 1998; 46(9):3590–5. doi: 10.1021/jf980154m.
210. van Klinger B, Ham M ten. Antibacterial activity of delta9-tetrahydrocannabinol and cannabidiol. *Antonie van Leeuwenhoek* 1976; 42(1-2):9–12. doi: 10.1007/BF00399444.
211. Martinenghi LD, Jønsson R, Lund T, Jensen H. Isolation, Purification, and Antimicrobial Characterization of Cannabidiolic Acid and Cannabidiol from *Cannabis sativa* L. *Biomolecules* 2020; 10(6). doi: 10.3390/biom10060900.
212. Appendino G, Gibbons S, Giana A, Pagani A, Grassi G, Stavri M et al. Antibacterial cannabinoids from *Cannabis sativa*: a structure-activity study. *J Nat Prod* 2008; 71(8):1427–30. doi: 10.1021/np8002673.
213. Wassmann CS, Højrup P, Klitgaard JK. Cannabidiol is an effective helper compound in combination with bacitracin to kill Gram-positive bacteria. *Sci Rep* 2020; 10(1):4112. doi: 10.1038/s41598-020-60952-0.
214. Blaskovich MAT, Kavanagh AM, Elliott AG, Zhang B, Ramu S, Amado M et al. The antimicrobial potential of cannabidiol. *Commun Biol* 2021; 4(1):7. doi: 10.1038/s42003-020-01530-y.
215. Burkhardt F, Bauernfeind A, Hrsg. *Mikrobiologische Diagnostik: Mit 192 Tabellen*. Stuttgart, New York: Thieme; 1992.
216. Janssen AM, Scheffer J, Baerheim Svendsen A. Antimicrobial activities of essential oils: A 1976–1986 literature review on possible applications. *Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition* 1987; (9):193–7.
217. Ács K, Balázs VL, Kocsis B, Bencsik T, Böszörményi A, Horváth G. Antibacterial activity evaluation of selected essential oils in liquid and vapor phase on respiratory tract pathogens. *BMC Complement Altern Med* 2018; 18(1):227. doi: 10.1186/s12906-018-2291-9.
218. Edris AE. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother Res* 2007; 21(4):308–23. doi: 10.1002/ptr.2072.
219. Houdkova M, Kokoska L. Volatile Antimicrobial Agents and In Vitro Methods for Evaluating Their Activity in the Vapour Phase: A Review. *Planta Med* 2020; 86(12):822–57. doi: 10.1055/a-1158-4529.

220. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47(5):565–73. doi: 10.1093/jac/47.5.565.
221. Inouye S, Tsuruoka T, Uchida K, Yamaguchi H. Effect of sealing and Tween 80 on the antifungal susceptibility testing of essential oils. *Microbiol Immunol* 2001; 45(3):201–8. doi: 10.1111/j.1348-0421.2001.tb02608.x.
222. Mondello F, Girolamo A, Scaturro M, Ricci ML. Determination of *Legionella pneumophila* susceptibility to *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil by an improved broth micro-dilution method under vapour controlled conditions. *J Microbiol Methods* 2009; 77(2):243–8. doi: 10.1016/j.mimet.2009.02.012.
223. Robertson OH, Bigg E, Puck TT, Miller BF. The Bactericidal Action of Propylene Glycol Vapor on Microorganisms suspended in Air - Part I. *J Exp Med* 1942; 75(6):593–610. doi: 10.1084/jem.75.6.593.
224. Manconi M, Petretto G, D'hallewin G, Escribano E, Milia E, Pinna R et al. Thymus essential oil extraction, characterization and incorporation in phospholipid vesicles for the antioxidant/antibacterial treatment of oral cavity diseases. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2018; 171:115–22. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.07.021.
225. Miler JA, Mayer B. Changes in the Frequency of Airway Infections in Smokers Who Switched To Vaping: Results of an Online Survey. *J Addict Res Ther* 2016; 7(4). doi: 10.4172/2155-6105.1000290.
226. Miler JA, Hajek P. Resolution of chronic nasal *Staphylococcus aureus* infection in a non-smoker who started to use glycerine based e-cigarettes: Antibacterial effects of vaping? *Med Hypotheses* 2018; 118:42–3. doi: 10.1016/j.mehy.2018.05.011.
227. Klijn SL, Hilgsmann M, Evers SMAA, Román-Rodríguez M, van der Molen T, van Boven JFM. Effectiveness and success factors of educational inhaler technique interventions in asthma & COPD patients: a systematic review. *NPJ Prim Care Respir Med* 2017; 27(1):24. doi: 10.1038/s41533-017-0022-1.
228. Melani AS, Bonavia M, Cilenti V, Cinti C, Lodi M, Martucci P et al. Inhaler mishandling remains common in real life and is associated with reduced disease control. *Respir Med* 2011; 105(6):930–8. doi: 10.1016/j.rmed.2011.01.005.
229. Molimard M, Raheison C, Lignot S, Balestra A, Lamarque S, Chartier A et al. Chronic obstructive pulmonary disease exacerbation and inhaler device handling: real-life assessment of 2935 patients. *Eur Respir J* 2017; 49(2). doi: 10.1183/13993003.01794-2016.
230. Scheunemann P, Schadow D, Stephenson P, Jermy M. Aerosol Generation by Condensation in Laminar Boundary Layers for Inhalers. In: Proceedings of the 22nd Australasian Fluid Mechanics Conference AFMC2020: The University of Queensland Brisbane, Australia; 2020 (Australasian Fluid Mechanics Conference (AFMC)).

## Lebenslauf

Die Seiten 163 – 164 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.



# Veröffentlichungen

## Publikationen

Bereswill S, Mousavi S, Weschka D, Buczkowski A, Schmidt S, Heimesaat MM. 2021. Peroral Clove Essential Oil Treatment Ameliorates Acute Campylobacteriosis-Results from a Preclinical Murine Intervention Study. *Microorganisms* 9(4):735. doi: 10.3390/microorganisms9040735.

Du K, Foote MS, Mousavi S, Buczkowski A, Schmidt S, Bereswill S, Heimesaat MM. 2022. Less Pronounced Immunopathological Responses Following Oral Butyrate Treatment of *Campylobacter jejuni*-Infected Mice. *Microorganisms* 10(10):1953. doi: 10.3390/microorganisms10101953.

## Patente

Strätling E-J, Welzel H-P, Buczkowski A, Scholtyssek P, Kumpugdee Vollrath M, Zingler A, Seklaoui A. 2020. Polymerzusammensetzung mit antiseptischen Eigenschaften und Verfahren zur Herstellung. Aktenzeichen DE: 10 2019 000 322.5. Deutsches Patent- und Markenamt

Strätling E-J, Welzel H-P, Buczkowski A, Scholtyssek P, Kumpugdee Vollrath M, Zingler A. 2020. Orale Polymerzusammensetzung mit verzögerter Freisetzung, Aktenzeichen DE: 10 2019 000 321.7. Deutsches Patent- und Markenamt

Welzel H-P, Strätling E-J, Buczkowski A, Scholtyssek P, Rawel HM, Wolf K, Paulke B-R. 2019. Lutein und -derivate enthaltende Zusammensetzung sowie Verfahren zur Herstellung. Aktenzeichen DE: 10 2017 009 186.2. Deutsches Patent- und Markenamt

Welzel H-P, Strätling E-J, Buczkowski A, Scholtyssek P, Rawel HM, Wolf K, Paulke B-R, Grigoriev D. 2018. Elektronische Zigarette und deren Fluid zur Inhalation. Aktenzeichen DE: 10 2017 003 667.5. Deutsches Patent- und Markenamt

## Poster

Buczkowski A, Welzel H-P, Strätling E-J, Bereswill S, Heimesaat MM, Melzig MF, Schmidt S. 2022. Role of calcium in the Eugenol-mediated reduction of Tobramycin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. 36. Schweizerische Jahrestagung für Phytotherapie – Tetranationale Tagung, Zürich.

Buczkowski A, Welzel H-P, Strätling E-J, Bereswill S, Heimesaat MM, Melzig MF, Schmidt S. 2022. Role of calcium in the Eugenol-mediated reduction of Tobramycin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. 70<sup>th</sup> International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research, Thessaloniki.

Krause J-P, Welzel H-P, Seidler T, Kumpugdee Vollrath M, Lehmann D, Maier M, Lemke S, Scholtyssek P, Fichtner K, Buczkowski A, Strätling E-J. 2016. 110<sup>th</sup> anniversary celebration of Hofmann & Sommer GmbH u. Co. KG

## Tagungen

Sakulku U, Helmis M, Buczkowski A, Kumpugdee-Vollrath M. 2015. Near Infrared Spectroscopy for pharmaceutical applications. Research Day 2015 Stadt der Zukunft. Beuth Hochschule für Technik.

## Danksagung

Die Seite 166 (Danksagung) enthält persönliche Daten. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.

## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**„Vergleichende Untersuchungen von Schlüsselkomponenten aus Dämpfen der E-Zigarette“**

selbstständig und ausschließlich unter der Benutzung der angegebenen Literaturquellen und Hilfsmittel angefertigt wurde. Ebenfalls bestätige ich, dass diese Arbeit weder in gleicher noch in ähnlicher Form an einer anderen Hochschule eingereicht wurde.

---

Agnes Johanna Buczkowski

Potsdam, 13.10.2022

## 8. Anhang

### 8.1 Material

#### 8.1.1 Chemikalien

##### *Liquids*

Cannabidiol	Hänseler AG – Swiss Pharma
Eucalyptusöl	Frey + Lau GmbH
Glycerin	Carl Roth GmbH + Co. KG
Minzöl	Frey + Lau GmbH
Nelkenöl	Frey + Lau GmbH
Propylenglycol	AppliChem GmbH
Tobramycin	Fagron GmbH & Co. KG
Wasser (HPLC-grade)	LGC Promochem GmbH

##### *Chemikalien, Reagenzien, Standardsubstanzen (ST)*

Acarbose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Acetonitril	LGC Promochem GmbH
Aktivkohle	Bioco Link Carbons (Pvt) Ltd.
$\alpha$ -Amylase ( <i>from Porcine Pancreas</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Azocasein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Cannabidiol ST	Merck KGaA
1,8-Cineol ST	Merck KGaA
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat	Honeywell International Inc.
3,5-Dinitrosalicylsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol (70%)	Hofmann & Sommer GmbH und Co. KG
Eugenol ST	Merck KGaA
Gallensäureextrakt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Isopropanol (2-Propanol)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Kaliumdihydrogenphosphat	Honeywell International Inc.
Kalium-Natrium-Tartrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Maltose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Menthol ST	Merck KGaA
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumdihydrogenphosphat	Honeywell International Inc.
Natriumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH + Co. KG
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Pankreatin ( <i>from Porcine Pancreas</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Salzsäure (37%)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Stärke, löslich	Merck KGaA
Trichloressigsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypsin (10x)	Biochrom GmbH, Deutschland
Wasser (HPLC-grade)	LGC Promochem GmbH

### *Medien und Nährböden*

BBL Mueller Hinton II Broth Cation Adjusted  
Columbia-Agar mit Schafblut Plus  
Chocolate Agar (GC II Agar with IsoVitaleX)  
Haemophilus Test Medium Supplement

Becton, Dickinson and Company  
Oxoid Deutschland GmbH  
Becton, Dickinson and Company  
Thermo Fisher Scientific Inc.

## 8.1.2 Geräte

### *Allgemein*

Analysenwaage AEJ 200-4CM  
Einkanalpipetten, divers  
Magnetrührer RCT standard  
pH-Meter Mettler Delta 320 Seven Easy  
Pipetten, Glas  
Präzisionswaage Sartorius  
ThermoMixer  
Vakuumpumpe  
Vortexmischer Reax top  
Wasserbad HB10  
Zentrifuge 3K20

Kern & Sohn GmbH  
Th. Geyer GmbH & Co. KG  
IKA-Werke GmbH & Co. KG  
Mettler-Toledo AG  
Brand GmbH + Co. KG  
Sartorius AG  
Eppendorf SE  
Vacuubrand GmbH & Co  
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG  
IKA Werke GmbH & Co. KG  
Sigma Laborzentrifugen GmbH

### *Probenahme-Konstruktion*

Aspire Cleito Clearomizer  
Aspire Cleito Atomizer (20-60, 55-70 Watt)  
e-Zigarette Cuboid Mini  
Massenflussmesser GFM  
Universal-Probenahmepumpe 224-PCMTX8

Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd.  
Shenzhen Eigate Technology Co., Ltd.  
Shenzhen Joytech Co., Ltd.  
Analyt-MTC Messtechnik GmbH  
SKC Ltd.

### *HPLC Analytik*

Autosampler 1050  
Degasser Series 200  
Detektor 1050 UV/Vis  
Interface 35900  
Pumpe 1050  
Säule Zorbax SB-C18  
Säulenofen 1050  
Software ChemStation

Hewlett Packard Inc.  
Perkin Elmer Inc.  
Hewlett Packard Inc.  
Hewlett Packard Inc.  
Hewlett Packard Inc.  
Agilent Technologies Inc.  
Hewlett Packard Inc.  
Agilent Technologies Inc.

### *GC Analytik*

Autosampler 7673A  
Detektor 5890 II FID  
Säule RTX 35 10423  
Software ChemStation  
Trägergas H<sub>2</sub>  
Vorsäule RTX 35

Hewlett Packard Inc.  
Hewlett Packard Inc.  
Restex GmbH  
Agilent Technologies Inc.  
Air Liquide S.A.  
Restex GmbH

### *Mikrobiologische Untersuchungen*

Autoklav S1000	Webeco GmbH & Co. KG
Autoklav Laboklav	Webeco GmbH & Co. KG
Analysenwaage R160 P	Sartorius AG
Einkanalpipetten research plus, divers	Eppendorf SE
Inkubator BB 16	Heraeus Holding
Mehrkanalpipette research plus, divers	Eppendorf SE
Mikroplatten-Reader Infinite	Tecan Trading AG
Photometer BioPhotometer	Eppendorf SE
Sicherheitswerkbank (Klasse II) KSP 15	Thermo Fisher Scientific Inc
Ultratiefkühlschrank HERAFreeze HLE	Thermo Fisher Scientific Inc.
Vortexmischer Lab dancer	VWR International GmbH

### 8.1.3 Verbrauchsmaterialien

#### *Allgemein*

Abwurfbeutel	Sarstedt GmbH & Co.KG
Bechergläser, divers	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Drigalski-Spatel, steril	Sarstedt GmbH & Co.KG
Falcon Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	Corning Inc.
Gaswaschflaschen-Aufsätze	Lenz Laborglas GmbH & Co. KG
Gaswaschflaschen nach Drechsel, h = 200 mm	Gebr. Rettberg GmbH
Halbmikroküvetten, PMMA, steril	Sarstedt GmbH & Co.KG
Impföse, steril	Thermo Fisher Scientific Inc.
Klebefolie für Mikrotiterplatten, Aluminium	Thermo Fisher Scientific Inc.
Kurzgewindeflasche ND9 (0,3 mL)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Kurzgewindeflasche ND9 (1,5 mL)	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Kurzgewindekappe ND9 mit Septum	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Mikrotiterplatten, 96-well, steril + Deckel	Sarstedt GmbH & Co.KG
Mörser, Porzellan	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Pasteurpipetten (3 mL), mikro, makro	Ratiolab GmbH
Pinzette	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Pipettenspitzen, divers	Sarstedt GmbH & Co.KG
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL, 5 mL)	Sarstedt GmbH & Co.KG
Reaktionsgefäße (1,5 mL, 2 mL), steril	Sarstedt GmbH & Co.KG
Schläuche, PVC	Rehau AG
Spritzen (1 mL), PP	Th. Geyer GmbH & Co. KG
Spritzenfilter, Porengröße: 0,45 µm, PA	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG
Zentrifugenröhrchen (15 mL, 50 mL)	VWR International GmbH

#### 8.1.4 Analysenzertifikate der Wirkstoffe

Die Seiten 171 – 177 (Analysenzertifikate der Wirkstoffe) enthalten firmeninterne Informationen. Sie sind deshalb nicht Bestandteil der Veröffentlichung.













## 8.2 Methoden

### 8.2.1 Wirkstoffhaltige Liquids

Tabelle 30: Zusammensetzung und Herstellung der untersuchten wirkstoffhaltigen Liquids – Basisliquid = Propylenglycol : Glycerin : Wasser (5:4:1); i.D. = im Dunkeln

Liquid	Zusammensetzung	Herstellung
<b>Eucalyptusöl-Liquid (EL)</b>	1% (w/w) Eucalyptusöl in Basisliquid	1,0 g Eucalyptusöl in 99,0 g Basisliquid mit einem Magnetrührer homogenisieren. $\rho = 1120 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Minzöl-Liquid (ML)</b>	1% (w/w) Minzöl in Basisliquid	1,0 g Minzöl in 99,0 g Basisliquid mit einem Magnetrührer homogenisieren. $\rho = 1120 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Nelkenöl-Liquid (NL)</b>	1% (w/w) Nelkenöl in Basisliquid	1,0 g Nelkenöl in 99,0 g Basisliquid mit einem Magnetrührer homogenisieren. $\rho = 1122 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Cannabidiol-Liquid (CL)</b>	0,5% (w/w) Cannabidiol in Basisliquid	0,5 g Cannabidiol in 99,5 g Basisliquid mit einem Magnetrührer homogenisieren. $\rho = 1123 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.
<b>Tobramycin-Liquid (TL)</b>	1% (w/w) Tobramycin in Basisliquid	1,55 g Tobramycin ( $f = 1,5456$ ) in 98,5 g Basisliquid mit einem Magnetrührer homogenisieren. $\rho = 1123 \text{ kg/m}^3$ Lagerung: 4°C i.D.

### 8.2.2 Biologische Suspensionen

Tabelle 31: Zusammensetzung und Herstellung der biologischen Suspensionen zur Untersuchung der Liquids und Aerosole mithilfe von Enzymaktivitäts-Assays – VE = vollständig entsalzen

Biologische Suspension	Physiologisch relevantes Enzym	Herstellung
<b>Synthetischer Speichel</b> Artificial human saliva (AHS)	$\alpha$ -Amylase	24 mg Dinatriumhydrogenphosphat, 2 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 80 mg Natriumchlorid und 20 mg $\alpha$ -Amylase in 8 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen. Mit Natronlauge auf pH 6,75 einstellen und mit VE-H <sub>2</sub> O auf 10 mL auffüllen. pH 6,75
<b>Humaner Speichel</b> Human saliva (HS)	$\alpha$ -Amylase	Sammlung mithilfe der Salivette von Probanden (nüchtern), frisch, pH 7,0 $\pm$ 0,1
<b>Modifizierter, synthetischer Intestinalsft</b> Modified artificial intestine fluid (mAIF)	Protease, $\alpha$ -Amylase	68 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 100 mg Pankreatin und 121 mg Gallensäureextrakt in 8 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen. Mit Natronlauge/ Salzsäure den pH-Wert einstellen und mit VE-H <sub>2</sub> O auf 10 mL auffüllen. pH 6,8 $\pm$ 0,1

### 8.2.3 Reagenzien für das $\alpha$ -Amylase-Assay

Tabelle 32: Zusammensetzung und Herstellung der Reagenzien zur Untersuchung der Liquids und Aerosole anhand des  $\alpha$ -Amylase-Assays – i.D. = im Dunkeln, NaOH = Natriumhydroxid, VE = vollständig entsalzen

Reagenzien	Herstellung
<b>Natronlauge, 2 mol/L:</b>	7,99 g NaOH in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen.
<b>Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS), 50 mmol/L:</b>	89 mg Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, 78 mg Natriumdihydrogenphosphat Dihydrat und 28 mg Natriumchlorid in 800 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen. Mit 2 N Natronlauge auf pH 7,0 einstellen und mit VE-H <sub>2</sub> O auf 1000 mL auffüllen.
<b>1%ige (w/v) Substratlösung:</b>	5,0 g lösliche Stärke in 450 ml PBS durch Erhitzen unter Rühren vollständig lösen. Nach dem Abkühlen mit PBS auf 500 mL auffüllen. <i>Lagerung bei 4°C</i>
<b>Farbreagenz (DNS), 44 mmol/L:</b>	100 mg 3,5-Dinitrosalicylsäure (DNS) in wenig VE-H <sub>2</sub> O anrühren. Durch Zugabe von 2 mL 2 N Natronlauge geht die Phenolsäure in Lösung. 3 g Kalium-Natrium-Tartrat Tetrahydrat langsam darin lösen und das Reagenz auf 10 mL mit VE-H <sub>2</sub> O auffüllen. <i>Lagerung i.D.</i>
<b>Maltose-Stammlsg. (MS), 10 mmol/L:</b>	36 mg Maltose in VE-H <sub>2</sub> O lösen und auf 10 mL auffüllen. <i>Lagerung bei 4°C</i>
<b>Acarbose-Lösung (<math>\alpha</math>-Amylasehemmung), 50 <math>\mu</math>mol/L:</b>	32,3 mg Acarbose in VE-H <sub>2</sub> O lösen und auf 1000 mL auffüllen. Die Stammlösung wird vor Gebrauch 1:2,5 in VE-H <sub>2</sub> O verdünnt.

### 8.2.4 Reagenzien für das Protease-Assay

Tabelle 33: Zusammensetzung und Herstellung der Reagenzien zur Untersuchung der Liquids und Aerosole anhand des Protease-Assays – HCl = Salzsäure, NaOH = Natriumhydroxid, VE = vollständig entsalzen

Reagenzien	Herstellung
<b>Salzsäure, 1 mol/L:</b>	3,65 g HCl in 100 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen.
<b>Natronlauge, 0,5 mol/L:</b>	19,99 g NaOH in 1000 mL VE-H <sub>2</sub> O lösen.
<b>1%ige (v/v) Trypsin-Lösung</b>	10,0 mL Trypsin (10x) mit 90,0 mL VE-H <sub>2</sub> O mischen.
<b>5%ige (v/v) Trichloressigsäure</b>	5,0 mL Trichloressigsäure mit 95,0 mL VE-H <sub>2</sub> O mischen.
<b>0,5%ige (w/v) NaHCO<sub>3</sub>-Pufferlösung:</b>	5 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) in 800 mL VE-H <sub>2</sub> O unter Rühren vollständig lösen. Mit 1 N Salzsäure auf pH 8,3 einstellen und mit VE-H <sub>2</sub> O auf 1000 mL auffüllen.
<b>2,5%ige (w/v) Azocasein-Lösung:</b>	2,5 g Azocasein in 80 mL VE-H <sub>2</sub> O durch Erwärmen unter Rühren lösen. Nach dem Abkühlen mit VE-H <sub>2</sub> O auf 100 mL auffüllen.

## 8.2.5 Flüssige Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen

Tabelle 34: Zusammensetzung und Herstellung der flüssigen Nährmedien zur Kultivierung von Mikroorganismen –  
HTM = Haemophilus Test Medium

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Herstellung</b>
<b>BBL™ Mueller Hinton II Broth Cation Adjusted</b>	3,0 g Rindfleischextrakt, 17,5 g Säurehydrolysat von Casein, 1,5 g Stärke	22 g Pulver in einem Liter destillierten Wasser suspendieren. Unter häufigem Schütteln erhitzen und zur vollständigen Auflösung des Pulvers eine Minute lang kochen lassen. 10 Minuten bei 116 – 121°C autoklavieren.
<b>Haemophilus Test Medium Supplement</b>	7,5 mg NAD, 7,5 mg Hämatin	s. Herstellung Müller-Hinton Medium. Auf 50°C abkühlen lassen und den Inhalt eines Fläschchens HTM Supplement pro 500 mL Medium nach Vorschrift aseptisch zugeben.

## 8.3 Validierung der chromatographischen Methoden

**Tabelle 35: Ergebnisse der Validierung der chromatographischen Methoden** – Die Akzeptanzkriterien der Validierungsparameter Linearität, Genauigkeit und Selektivität wurden erfüllt. AK = Akzeptanzkriterium, R = Regressionskoeffizient; VK = Variationskoeffizient

Validierungsparameter	Akzeptanzkriterium (AK)	Ergebnis	AK erfüllt
<b>Linearität</b>			
<i>Kalibrierung von Referenzstandards</i>			
1,8-Cineol		$y = 200535x + 3528$ , $R = 0,9996$	ja
Menthol	Regressionskoeffizient	$y = 2557,43x - 26,37$ , $R = 0,9999$	Ja
Eugenol	$R \geq 0,995$	$y = 140902x - 5016$ , $R = 0,9984$	Ja
Cannabidiol		$y = 45,56x + 10,23$ , $R = 0,9999$	Ja
<b>Genauigkeit - Richtigkeit</b>			
<i>n = 9 - Wiederfindungsrate von drei Konzentrationen (n = 3)</i>			
1,8-Cineol		99,9%; VK = 0,23%	Ja
Menthol	$\geq 95\% \leq 105\%$ ;	98,5%; VK = 1,88%	Ja
Eugenol	Variationskoeffizient (VK)	99,6%; VK = 1,80%	Ja
Cannabidiol	$\leq 5\%$	97,0%; VK = 3,44%	Ja
<b>Genauigkeit - Präzision</b>			
<i>Messpräzision n = 6 - Wiederfindungsrate</i>			
1,8-Cineol		98,0%; VK = 0,94%	Ja
Menthol	$\geq 95\% \leq 105\%$ ;	96,0%; VK = 0,14%	Ja
Eugenol	Variationskoeffizient (VK)	99,2%; VK = 0,73%	Ja
Cannabidiol	$\leq 1\%$	99,1%; VK = 0,36	Ja
<i>Methodenpräzision n = 27 - Wiederfindungsrate von drei Konzentrationen an drei Tagen (n = 3)</i>			
1,8-Cineol		99,1%; VK = 1,80%	Ja
Menthol	$\geq 95\% \leq 105\%$ ;	98,2%; VK = 0,66%	Ja
Eugenol	Variationskoeffizient (VK)	98,1%, VK = 1,90%	Ja
Cannabidiol	$\leq 5\%$	98,9%; VK = 0,89%	Ja
<b>Selektivität</b>			
<i>n = 9 - Wiederfindungsrate von drei Konzentrationen in Basisliquid (n = 3)</i>			
1,8-Cineol		101,7%; VK = 0,88%	Ja
Menthol	$\geq 95\% \leq 105\%$ ;	99,5%; VK = 0,47%	Ja
Eugenol	Variationskoeffizient (VK)	101,8%; VK = 3,21%	Ja
Cannabidiol	$\leq 5\%$	103,5%; VK = 4,19%	Ja