

**Herstellung von Birkenkorkextrakten mit überkritischer  
Fluidtechnologie sowie Charakterisierung der Extrakte und  
deren Einsatz zur Stabilisierung halbfester Systeme**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Markus Armbruster

aus Freudenstadt

Tübingen

2017







# **Herstellung von Birkenkorkextrakten mit überkritischer Fluidtechnologie sowie Charakterisierung der Extrakte und deren Einsatz zur Stabilisierung halbfester Systeme**

**Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Markus Armbruster

aus Freudenstadt

Tübingen

2017

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Prüfung:

31.08.2017

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Martin A. Wahl

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Rolf Daniels

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Martin A. Wahl für das Überlassen des Themas und die Unterstützung während der letzten Jahre. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rolf Daniels, sowie bei sämtlichen Kolleginnen und Kollegen der Arbeitskreise Wahl und Daniels für die Hilfsbereitschaft, Kameradschaft und dadurch unvergessliche Zeit in der Pharmazeutischen Technologie Tübingen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Birken AG für die Bereitstellung des Birkenkorks und diverser HPLC Referenzsubstanzen bedanken.

Herrn Mathias Mönckedieck von der Abteilung für pharmazeutische Technologie und Biopharmazie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich für die Durchführung der iGC Messungen danken.

Mein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie, meinen Freunden und Ulrike für die moralische Unterstützung, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

## **Besondere Hinweise:**

Sofern nicht anders angegeben, entsprechen Fehlerbalken und  $\pm$  Kennzeichnungen der Standardabweichung des Mittelwertes bei  $n \geq 3$  und der Spannweite bei  $n = 2$ .

Statistische Signifikanz wird über F- und T-Tests mit einem Signifikanzlevel von  $p = 0,05$  nachgewiesen. Als Prüfung auf Normalverteilung dient der Kolmogorov-Smirnov-Test.

Gesetzlich geschützte Warenzeichen werden ohne Kennzeichnung verwendet.

Eine Übersicht über die Extraktionsparameter sämtlicher Chargen findet sich unter 7.2.

Diese Dissertation wurde am Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie an der Eberhard Karls Universität Tübingen erstellt. Hiermit erkläre ich, dass ich diese Arbeit selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

**Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:**

**Kongressbeiträge:**

*Characterization of Birch Bark Extrakt obtained by supercritical fluid technology*

Markus Armbruster, Martin A. Wahl

DPHG Annual Meeting, 9. - 11. Oktober 2013, Freiburg (Poster)

*Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid*

Markus Armbruster

2. Doktorandenkolleg, 9. Mai 2015, Wala Heilmittel GmbH, Bad Boll (Vortrag)

*Birch bark extract particle deposition from supercritical solutions and use for stabilisation of semisolid systems*

Markus Armbruster, Mathias Mönckedieck, Regina Scherließ, Martin A. Wahl

DPHG Annual Meeting, 23. - 25. September 2015, Düsseldorf (Poster)

**Veröffentlichung in Fachzeitschriften:**

*Birch bark dry extract by supercritical fluid technology: extract characterisation and use for stabilisation of semisolid systems*

Markus Armbruster, Mathias Moenckedieck, Regina Scherließ, Rolf Daniels, Martin A. Wahl

Applied Sciences 292(7)



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abbildungsverzeichnis .....	V
Tabellenverzeichnis .....	IX
Formelverzeichnis .....	X
Abkürzungsverzeichnis, Zeichen und Symbole .....	XI
1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen .....	1
1.1 Einleitung .....	1
1.2 Zielsetzung .....	3
1.3 Die Birke und ihre Inhaltsstoffe .....	6
1.3.1 Die Birke als Nutz- und Heilpflanze in der Geschichte .....	6
1.3.2 Die Birke und ihre Inhaltsstoffe im Fokus der Wissenschaft .....	6
1.4 Überkritische Fluide .....	10
1.4.1 Geschichte und Einsatzgebiete überkritischer Fluide .....	10
1.4.2 Eigenschaften von überkritischem Kohlendioxid .....	11
1.4.3 Thermodynamische und physikalische Betrachtungen des überkritischen Zustandes mit Fokus auf die Anwendung bei der Extraktion .....	12
1.4.4 Partikelabscheidung aus überkritischer Lösung .....	16
1.4.5 Der Joule-Thomson-Effekt .....	17
1.5 Rheologische Charakterisierung halbfester Zubereitungen .....	18
1.5.1 Definition und Klassifizierung halbfester Zubereitungen .....	18
1.5.2 Birkenkorkextrakt als Emulgator und Gelbildner .....	19
1.5.3 Rheologie halbfester Zubereitungen .....	19
1.5.4 Rheologische Vermessung halbfester Zubereitungen .....	20
1.6 Charakterisierung von Oberflächen .....	23
1.6.1 Bedeutung der Oberfläche von Triterpentrockenextrakten für die Herstellung halbfester Zubereitungen .....	23
1.6.2 Die BET-Methode zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche .....	24

1.6.3	Messung der Oberflächenenergie mit inverser Gaschromatographie ...	25
2	Material und Methoden .....	28
2.1	Materialien und Geräte .....	28
2.2	Methoden.....	31
2.2.1	Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid.....	31
2.2.2	HPLC-Analytik von Triterpenen.....	39
2.2.3	Rheologische Charakterisierung halbfester Zubereitungen .....	41
2.2.4	Rasterelektronenmikroskopie (REM) .....	44
2.2.5	FTIR Spektroskopie .....	44
2.2.6	Messung der spezifischen Oberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller (BET) .....	44
2.2.7	Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergie durch inverse Gaschromatographie (iGC) .....	45
2.2.8	DSC Analyse (Differential Scanning Calorimetry) .....	45
3	Ergebnisse und Diskussion .....	46
3.1	Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid.....	46
3.1.1	Entnahme und Nachbehandlung der Extrakte .....	46
3.1.2	Optimierung der Ausbeute bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid .....	46
3.1.3	Ausbeute und Temperaturerfassung bei verschiedenen Setups der RESS-Extraktion .....	57
3.1.4	Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO <sub>2</sub> .....	59
3.2	Zusammensetzung der hergestellten Triterpentrockenextrakte aus Birkenrinde .....	61
3.2.1	Vergleich der Triterpenzusammensetzung bei unterschiedlichen Extraktionsmethoden .....	61
3.2.2	Einfluss der Extraktionsparameter auf die Zusammensetzung von Triterpentrockenextrakten aus Birkenrinde .....	63

3.2.3	Triterpenzusammensetzung bei fraktionierter Extraktion .....	64
3.2.4	Zusammenfassung der Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten aus überkritischer Fluidextraktion.....	66
3.3	Stabilisierung halbfester Zubereitungen mit Triterpen-trockenextrakt aus Birkenrinde, gewonnen mit überkritischer Fluidtechnologie .....	67
3.3.1	Rheologische Charakterisierung von Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakten aus unterschiedlicher Extraktionsmethodik .....	67
3.3.2	Einfluss der Lagerdauer der Extrakte auf die Gelbildung.....	72
3.3.3	Strukturaufbau und -veränderung über die Zeit bei Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakt .....	73
3.3.4	Einfluss der Extrakt Konzentration auf die Gelbildung .....	77
3.3.5	Manuelle Gelherstellung mit Lösemittlextrakt und überkritischem Fluidextrakt .....	80
3.3.6	Stabilisierung von Cremes mit Lösemittlextrakt und überkritischem Fluidextrakt .....	81
3.3.7	Direkte Gelherstellung im RESS-Verfahren .....	83
3.3.8	Diskussion der Mechanismen zur Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt aus überkritischer Fluidextraktion	86
3.3.9	Zusammenfassung der Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen mit Birkenkorkextrakten .....	95
4	Abschlussdiskussion .....	98
4.1	Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid.....	98
4.1.1	Extraktion mit Partikelabscheidung im Separator (SCF-Extrakte).....	98
4.1.2	RESS-Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid ....	100
4.1.3	Direkte Gelherstellung durch RESS-Extraktion von Birkenrinde .....	102
4.2	Stabilisierung halbfester Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt aus überkritischer Fluidtechnologie .....	103
4.2.1	Gelstärke, Gelcharakter und thixotropes Verhalten von Zubereitungen stabilisiert mit überkritischen Fluidextrakten .....	103

4.2.2	Veränderung der Geleigenschaften über die Zeit .....	104
4.2.3	Einfluss des Extraktgehaltes auf die Gelbildung .....	105
4.2.4	Stabilisierung von Cremes mit überkritischen Fluidextrakten aus Birkenrinde.....	106
4.2.5	Extraktanalytik und Mechanismen zur Gelbildung .....	106
5	Zusammenfassung .....	109
6	Literaturverzeichnis .....	111
7	Anhang .....	120
7.1	Daten zur Kalibrierung der HPLC-Methode zur Bestimmung der Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten .....	120
7.2	Übersicht wichtiger Extraktionsparameter der einzelnen Chargen .....	129
7.3	Übersicht über die Zusammensetzung von Cremes stabilisiert mit Birkenkorkextrakt (3.3.6).....	132
7.4	Abscheidebehälter für modifiziertes RESS-Verfahren .....	133

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln pentazyklischer Triterpene aus Birkenkork.....	7
Abbildung 2: Schematisches Phasendiagramm von Kohlendioxid .....	12
Abbildung 3: Schematisches p/V-Diagramm eines überkritischen Fluids nach van der Waals.....	13
Abbildung 4: Verlauf eines Amplitudensweeps für eine Substanz mit strukturviskosem Verhalten .....	21
Abbildung 5: Verlauf eines ITT für eine Substanz mit strukturviskosem und partiell thixotropem Verhalten.....	22
Abbildung 6: Gaschromatographische Prinzipien in verschiedenen Bereichen der Analytik.....	27
Abbildung 7: Schaltplan der CO <sub>2</sub> Extraktionsanlage:.....	32
Abbildung 8: Fixierung von Birkenkork in B5 mit Glaskugeln und Gewicht.....	35
Abbildung 9: Verschiedene Abscheidemethoden für Extraktpartikel aus überkritischer Lösung.....	37
Abbildung 10: Extraktionsausbeute bei verschiedenen Extraktionsdrücken und den daraus resultierenden CO <sub>2</sub> -Dichten .....	47
Abbildung 11: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO <sub>2</sub> .....	49
Abbildung 12: Abhängigkeit der Ausbeute von CO <sub>2</sub> -Massenfluss (MF) bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO <sub>2</sub> .....	50
Abbildung 13: Verlauf der Ausbeute bei dreifach fraktionierter Extraktion von Birkenkork im Separator- und RESS-Verfahren und Verteilung der Ausbeute auf die einzelnen Fraktionen .....	52
Abbildung 14: Verlauf der Ausbeute bei zehnfach fraktionierter Extraktion von Birkenkork (F1-F10) im RESS-Verfahren .....	53
Abbildung 15: Ausbeute bei der Extraktion verschiedener Ausgangsmassen Birkenkork mit überkritischem CO <sub>2</sub> .....	54
Abbildung 16: Ausbeute bei verschiedenen Setups im Extraktor: Ausgangsmaterial mit Glaskugeln vermischt und mit einem Gewicht fixiert gegen loses Einfüllen des Birkenkorks.....	55
Abbildung 17: Extraktionsausbeute bei vorhergehender Inkubation des Birkenkorks in CO <sub>2</sub> .....	56

Abbildung 18: Ausbeute der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO <sub>2</sub> bei unterschiedlichen Separator-Entspannungsgeschwindigkeiten.....	57
Abbildung 19: Vergleich der Ausbeuten bei verschiedenen Setups der fraktionierten (F1-F10) RESS-Extraktion von Birkenkork .....	58
Abbildung 20: Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten bei unterschiedlichen Extraktionsmethoden .....	62
Abbildung 21: Einfluss von Druck, Temperatur und Massenfluss auf die Zusammensetzung der Hauptbestandteile von Triterpentrockenextrakten bei Extraktion mit überkritischem CO <sub>2</sub> .....	64
Abbildung 22: Verlauf des Anteils der Hauptbestandteile von Triterpentrockenextrakt bei fraktionierter Extraktion (F1-F10) desselben Materials mit überkritischem CO <sub>2</sub> ..	64
Abbildung 23: Verlauf der aufsummierten Extraktionsausbeute im RESS-Verfahren über zehn Fraktionen (F) für Betulin und Lupeol .....	66
Abbildung 24: Amplitudensweep von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (TE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt (repräsentative Kurven für die jeweilige Extraktart) .....	68
Abbildung 25: Vergleich der Gelstärke von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (OSE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt .....	69
Abbildung 26: Verlustfaktor von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (OSE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt.....	70
Abbildung 27: Intervall-Thixotropie-Test von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (TE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt (repräsentative Kurven für die jeweilige Extraktart) .....	71
Abbildung 28: Verhalten im Intervall Thixotropie Test (ITT) von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (TE und TE roh), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt .....	72
Abbildung 29: Verhalten von überkritischen Fluidextrakten (SCFE) hinsichtlich Gelbildung bei Lagerung der Extrakte über ein Jahr .....	73
Abbildung 30: Verhalten von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) während der ersten sechs Stunden nach Herstellung .....	74
Abbildung 31: Verlustfaktor von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) während der ersten sechs Stunden nach Herstellung .....	75

Abbildung 32: Gelstärke bei Lagerung von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	76
Abbildung 33: Gelcharakter bei Lagerung von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	77
Abbildung 34: Gelstärke in Abhängigkeit vom Extraktgehalt an Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	78
Abbildung 35: Gelcharakter in Abhängigkeit vom Extraktgehalt an Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	79
Abbildung 36: Gele mit unterschiedlichem Gehalt an Triterpenextrakt aus Lösemittel-extraktion (oben) und überkritischer Fluidextraktion (unten) .....	79
Abbildung 37: Gelstärke bei manueller Gelherstellung mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	81
Abbildung 38: Gelstärke und Thixotropie bei Cremes mit unterschiedlichem Wassergehalt stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) .....	82
Abbildung 39: Amplitudensweep einer Zubereitung (R8.1) aus direkter Gelherstellung im RESS-Verfahren .....	84
Abbildung 40: Gelstärke von Zubereitungen aus direkter Herstellung im RESS-Verfahren .....	85
Abbildung 41: Gelcharakter von Zubereitungen aus direkter Herstellung im RESS-Verfahren .....	86
Abbildung 42: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von zwei SCF-Extrakten ....	87
Abbildung 43: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von zwei LM-Extrakten .....	88
Abbildung 44: Gelstärke in Abhängigkeit von der Extrakt-oberfläche bei fraktionierter RESS-Extraktion (F1-F10) .....	88
Abbildung 45: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von RESS-Extrakten .....	89
Abbildung 46: IR-Spektrum von Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakt .....	92
Abbildung 47: Thermogramm verschiedener Triterpentrockenextrakte .....	93
Abbildung 48: Thermogramm von fraktionierten RESS-Extrakten .....	94
Abbildung 49: Gelstärke in Abhängigkeit vom Schmelzpunkt des stabilisierenden Extraktes .....	95
Abbildung 50: Gelstärke in Abhängigkeit der spezifischen Oberfläche des stabilisierenden Extraktes .....	96

Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol (1. Abschnitt; 0-15 min).....	121
Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol (2. Abschnitt; 30-45 min).....	122
Abbildung 53: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Betulin.....	123
Abbildung 54: Residuenplot für die HPLC Analyse von Betulin .....	124
Abbildung 55: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Betulinsäure.....	124
Abbildung 56: Residuenplot für die HPLC Analyse von Betulinsäure .....	125
Abbildung 57: Kalibriergerade für die HPLC Analytik von Oleanolsäure .....	125
Abbildung 58: Residuenplot für die HPLC Analyse von Oleanolsäure.....	126
Abbildung 59: Kalibriergerade zur HPLC Analyse von Erythrodiol .....	126
Abbildung 60: Residuenplot zur HPLC Analyse von Erythrodiol.....	127
Abbildung 61: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Lupeol.....	127
Abbildung 62: Residuenplot für die HPLC Analyse von Lupeol .....	128
Abbildung 63: Abscheidebehälter für modifiziertes RESS-Verfahren .....	133



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pharmakologische Effekte von Triterpenen aus Birkenkork (modifiziert nach Laszczk 2007).....	8
Tabelle 2: Daten kritischer Punkte verschiedener Gase .....	11
Tabelle 3: Vergleich physikalischer Parameter in der flüssigen, gasförmigen und überkritischen Phase .....	15
Tabelle 4: Berechnungsmethoden zur Bestimmung der Oberflächenenergie.....	26
Tabelle 5: Verwendete Geräte .....	28
Tabelle 6: Verwendete Materialien .....	29
Tabelle 7: Verwendete Software.....	30
Tabelle 8: Übersicht über verschiedene Extraktionsparameter bei der Partikelabscheidung im Separator .....	34
Tabelle 9: Fließmittelprogramm zur Trennung von Triterpenen aus Birkenkorkextrakt .....	39
Tabelle 10: Zusammenfassung der Validierungsparameter zur HPLC-Analytik von Triterpenen .....	40
Tabelle 11: Fortsetzung Zusammenfassung der Validierungsparameter zur HPLC-Analytik von Triterpenen .....	40
Tabelle 12: Parameter für Amplitudensweep .....	43
Tabelle 13: Parameter für 3-Intervall-Thixotropie-Test .....	43
Tabelle 14: Standardbedingungen für die Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid .....	59
Tabelle 15: Triterpenzusammensetzung von Lösemittelextrakten (Birken AG) .....	61
Tabelle 16: Oberflächencharakteristik verschiedener Triterpentrockenextrakte mit resultierender Gelstärke .....	90
Tabelle 17: Validierungsparameter zur HPLC Analytik von Triterpenen .....	122
Tabelle 18: Zusammenstellung wichtiger Extraktionsparameter und Extrakteigenschaften bei klassischer Partikelabscheidung im Separator .....	129
Tabelle 19: Zusammenstellung wichtiger Extraktionsparameter und Extrakteigenschaften bei RESS-Extraktion.....	130
Tabelle 20: Zusammensetzung von Cremes stabilisiert mit OSE und SCFE.....	132

## Formelverzeichnis

Formel 1: Van-der-Waals-Zustandsgleichung .....	13
Formel 2: Erstes Fick'sches Diffusionsgesetz .....	14
Formel 3: Einstein-Smoluchowski-Beziehung.....	14
Formel 4: Beweglichkeit kugelförmiger Teilchen nach Stokes.....	15
Formel 5: BET-Gleichung (nach Brunauer, Emmet und Teller 1938) .....	24
Formel 6: Steigung m und Achsenabschnitt c abgeleitet aus der BET-Gleichung....	24
Formel 7: Berechnung des Gasvolumens einer monomolekularen Schicht.....	24
Formel 8: Berechnung der Gesamtoberfläche einer BET Probe .....	25
Formel 9: Young'sche Gleichung.....	25
Formel 10: Formel zur Auswertung einer iGC-Messung nach Schultz .....	27
Formel 11: Berechnung der Rest-SD $S_y$ .....	120
Formel 12: Berechnung der Verfahrensstandardabweichung $S_{x0}$ .....	120
Formel 13: Berechnung der relativen Verfahrensstandardabweichung $V_{x0}$ .....	121
Formel 14: Berechnung der Bestimmungsgrenze nach ICH Q2(R1) .....	121
Formel 15: Berechnung der Nachweisgrenze nach ICH Q2(R1) .....	121

## Abkürzungsverzeichnis, Zeichen und Symbole

3ITT	3-Intervall-Thixotropie-Test
AG	Aktiengesellschaft
AS	Amplitudensweep
BE	Betulin
BET	Brunauer Emmet Teller
BS	Betulinsäure
ca.	circa
com.	Communications
ER	Erythrodiol
et al	et alii (und andere)
FID	Flammenionisationsdetektor
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iGC	inverse Gaschromatographie, inverser Gaschromatograph
Inc.	Incorporated
LM-E	Lösemittelextrakt
Ltd.	Limited
LU	Lupeol
LVE	Linear viskoelastischer Bereich
Ø in.	Innendurchmesser
n.s.	nicht signifikant
OS	Oleanolsäure
os	Lösemittel (organic solvent)
PP	Polypropylen
s.a.	siehe auch
sc	überkritisch (supercritical)
SCF	überkritisches Fluid
SCF-E	überkritischer Fluidextrakt
TE / OSE	Triterpentrockenextrakt aus Lösemittelextraktion



# 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

## 1.1 Einleitung

Halbfeste Zubereitungen wie Salben, Cremes und Gele sind aus unserem Alltag nicht mehr wegzudenken. Dabei können pflegende und kosmetische, aber auch medizinische Eigenschaften der Zubereitungen im Vordergrund stehen. Ist ein Wirkstoff enthalten, so kann eine lokale Wirkung erzielt werden, oder es kommt nach Resorption des Arzneistoffs zu einer systemischen Wirkung. Unter der Rubrik Dermatika in der Gelben Liste finden sich derzeit 1609 zugelassene Medikamente (Stand Juli 2016). Zusätzlich zu diesen Fertigarzneimitteln werden jährlich mehrere Millionen (7,9 in 2013 [1]) Individualrezepturen in deutschen Apotheken hergestellt. Dies zeigt, dass die Haut als Applikationsort für Arzneimittel eine große Rolle spielt.

Für den Therapieerfolg bei der Applikation von Dermatika ist nicht nur der Wirkstoff verantwortlich, sondern auch die Grundlage der Rezeptur. Sie kann sowohl die Freisetzung als auch die Resorption des Wirkstoffes beeinflussen. Außerdem sind an die Grundlage gewisse Anforderungen zu stellen, um den Therapieerfolg und die Patientensicherheit zu gewährleisten. So müssen Grundlagen für halbfeste Zubereitungen eine ausreichende mikrobielle Stabilität aufweisen. Vor allem bei Cremes und Hydrogelen, die einen hohen Wasseranteil aufweisen, wird dies häufig nur durch Einsatz von Konservierungsmitteln erreicht. Bei Cremes kommt zusätzlich die Problematik der thermodynamischen Instabilität hinzu. Hier gilt es die wässrige und die ölige Phase der Grundlage bei geeigneter Tröpfchengröße zu stabilisieren, um eine Koaleszenz der Phasen und schließlich ein Brechen der Creme zu verhindern. Bei vielen Produkten kommt dabei ein komplexes Emulgatorgemisch zum Einsatz. Die eingesetzten Emulgatoren und Konservierungsmittel haben häufig ein hohes allergenes Potential und können zu Hautirritationen führen. Somit kann es bei der Entwicklung von halbfesten Arzneimitteln von Vorteil sein, sich auf wenige und dabei gut verträgliche Ausgangsstoffe zu beschränken. Das Erreichen einer ausreichenden mikrobiellen, chemischen und thermodynamischen Stabilität ist dabei eine große Herausforderung.

Einen möglichen Lösungsansatz für diese Problematik bietet der Einsatz von Triterpentrockenextrakten, welche aus Birkenrinde gewonnen werden können. Diese

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Extrakte sind in der Lage als Gelbildner in Oleogelen zu fungieren und Cremes als Pickering-Emulgatoren zu stabilisieren [2-4]. Da Betulin der Hauptbestandteil der Extrakte ist, werden diese feststoffstabilisierten Cremes auch als „Betulsionen“ bezeichnet [2]. Somit besteht die Möglichkeit aus Öl, Wasser und Extrakt eine halb feste Zubereitung herzustellen. Die dermatologische Verträglichkeit solcher Zubereitungen wurde bereits nachgewiesen [3]. Im medizinisch kosmetischen Bereich befinden sich derzeit mehrere Produkte (Imlan Serie) auf dem Markt, welche mit Birkenkorkextrakt stabilisiert werden. Zusätzlich zu den interessanten galenischen, weist Birkenkorkextrakt auch zahlreiche pharmakologische Eigenschaften auf. Für die Konservierung halbfester Zubereitungen sind die antimikrobiellen Effekte des Extraktes von großer Bedeutung [5]. Außerdem weist der Extrakt wundheilungsfördernde Eigenschaften auf [6-8]. Dies ermöglicht den sinnvollen Einsatz auf verletzter, geröteter und irritierter Haut.

Birkenkorkextrakte für die Herstellung halbfester Zubereitungen werden derzeit durch Extraktion von Birkenrinde mit organischen Lösemitteln gewonnen [2]. Um den benötigten Trockenextrakt zu erhalten, muss anschließend das Lösemittel aufwändig entfernt werden und der Nachweis erfolgen, dass bestimmte Grenzwerte im Extrakt nicht überschritten werden. Viele organische Lösemittel sind brennbar und explosionsgefährlich. Dies stellt neben der potentiellen Gefahr für die Gesundheit und die Umwelt, sowie der aufwändigen Entsorgung, einen weiteren Nachteil von organischen Lösemitteln dar. Als Alternative kann überkritisches Kohlendioxid als Extraktionsmittel verwendet werden [9; 10]. Oberhalb des kritischen Punktes herrschen Bedingungen, welche für die Extraktion interessant sein können. So weist überkritisches CO<sub>2</sub>, bei gleichzeitig geringer Viskosität und hohem Diffusionsvermögen, eine flüssigkeitsähnliche Dichte auf [11; 12]. Der kritische Punkt für CO<sub>2</sub> ist mit ~31 °C und ~74 bar technisch einfach zu realisieren und ermöglicht die Extraktion bei schonenden Temperaturen. Wird das überkritische Fluid auf unterkritische Bedingungen entspannt, so verflüchtigt sich das nunmehr gasförmige CO<sub>2</sub> ohne separaten Schritt und kann recycelt werden. Dabei können verschiedene Methoden zur Partikelabscheidung angewendet werden. Üblicherweise wird die überkritische Lösung in einen Separator entspannt, aus welchem der Extrakt, nach Erreichen der gewünschten Extraktionszeit, entnommen werden kann. Die Abscheidung der Extraktpartikel erfolgt dabei aus einer CO<sub>2</sub>-Flüssigphase. Im RESS-

Verfahren (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) wird die überkritische Lösung direkt in die Gasphase verdüst, um besonders feine Partikel zu erhalten [13; 14].

Versuche zur Abscheidung von Birkenkorkextrakt aus flüssigem CO<sub>2</sub>, zur Umgehung der Nachteile einer Lösemittelextraktion, werden von Krasutsky 2003 beschrieben [9]. Ebenfalls 2003 wird eine Methode zur Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem CO<sub>2</sub> von Zhang vorgeschlagen [15]. Ein Verfahren von Sarek aus 2009 zur Gewinnung von Betulin umfasst die Umsetzung von Birkenrinde mit einem Gemisch aus Acetanhydrid und Pyridin zur Acetylierung des Betulins mit anschließender sc CO<sub>2</sub>-Extraktion und abschließender Desacetylierung durch Kaliumhydroxid in alkoholischem Medium [10]. Durch die aufgrund der Acetylierung erhöhten Lipophile, soll die Extraktausbeute verbessert werden. Keines der genannten Verfahren zielt dabei auf die Nutzung des Birkenkorkextraktes zur Stabilisierung halbfester Zubereitungen ab. Es werden außerdem keine Abscheidemethoden im RESS-Verfahren für die Birkenkorkextraktpartikel beschrieben.

### **1.2 Zielsetzung**

In der folgenden Arbeit wird ein Verfahren für die Extraktion von Birkenkork an der hauseigenen Extraktionsanlage der pharmazeutischen Technologie der Universität Tübingen entwickelt. Als Extraktionsmittel soll dabei überkritisches Kohlendioxid zum Einsatz kommen, welches eine umweltfreundlichere Alternative zu organischen Lösemitteln darstellt. Diese Arbeit umfasst die Optimierung der Extraktionsbedingungen durch Variation der Extraktionsparameter, die Anwendung verschiedener Abscheidemethoden für Extraktpartikel aus überkritischer Lösung und die Entwicklung eines Verfahrens zur direkten Gelherstellung durch Versprühen der überkritischen Lösung in eine lipophile Grundlage.

Durch Variation der Extraktionsparameter Druck, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Dichte und CO<sub>2</sub>-Massenfluss, sowie durch fraktionierte Extraktion, sollen Bedingungen für eine möglichst hohe Extraktionsausbeute gefunden werden. Außerdem wird getestet, ob eine Veränderung dieser Parameter Einfluss auf die Extraktionseigenschaften hat. Dies könnte die gezielte Produktion von Extrakten mit bestimmten galenischen und pharmakologischen Eigenschaften ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit, um Einfluss auf die Extraktmorphologie zu nehmen, könnte die Partikelabscheidung im RESS-

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Verfahren bieten. Das Ziel dabei ist es Extrakte herzustellen, die bei der Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen Vorteile gegenüber Lösemittlextrakten aus Birkenrinde aufweisen. Die Entwicklung einer Methode zur direkten Gelherstellung im RESS-Extraktionsverfahren würde die Produktion einer halbfesten Zubereitung in einem einzelnen Prozessschritt möglich machen und dadurch Potential für Einsparungen an Arbeitszeit, Material und Energie bieten.

Mit den produzierten überkritischen Fluidextrakten werden Gele und Cremes hergestellt, diese rheologisch charakterisiert und mit Zubereitungen verglichen, welche mit Extrakten aus organischer Lösemittlextraktion stabilisiert sind. Dabei sollen oszillatorische Messungen zum Einsatz kommen und Daten zur Viskosität, Thixotropie und zum elastischen- und viskosen Verhalten liefern. Eine Analyse der Fließeigenschaften soll Aufschluss über Unterschiede einzelner Extraktchargen und Extraktarten bei der Stabilisierung der Zubereitungen aufzeigen. Kenntnisse über die Viskosität und das plastische Verhalten können helfen eine optimale patientengerechte Therapie zu gewährleisten.

Für die Bestimmung der Triterpenzusammensetzung in den Extrakten wird eine HPLC-Methode zur Quantifizierung von Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Lupeol und Erythrodiol entwickelt. Dadurch wird ein analytischer Zugang zum Einfluss dieser Hauptbestandteile auf die Stabilisierung halbfester Zubereitungen geschaffen. Außerdem können so Extraktionsparameter gefunden werden, durch die ein bestimmtes Triterpenverhältnis im Extrakt eingestellt werden kann. Verschiedene pharmakologische Eigenschaften der einzelnen Extraktbestandteile könnten so gesteuert werden.

Da es Hinweise darauf gibt, dass die Extraktoberfläche bei der Stabilisierung halbfester Systeme eine Rolle spielt [2], werden Messungen zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche und der dispersiven Oberflächenenergie durchgeführt und die Ergebnisse mit denen von Lösemittlextrakten verglichen. Die Oberflächenanalytik soll weitere Erkenntnisse zum Mechanismus bei der Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt liefern und zeigen, ob sich überkritische Fluidextraktion dafür eignet, bei der Extrakterstellung gezielt Einfluss auf die Oberflächenbeschaffenheit der Extrakte zu nehmen.



## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Ziel der Arbeit ist es, die Eignung der überkritischen Fluidextraktion für die Herstellung von Birkenkorkextrakten zu testen, neue Abscheidemethoden im RESS-Verfahren zu entwickeln, Extrakte zu charakterisieren und mit Hilfe der Extrakte die Stabilisierung halbfester Zubereitungen zu verbessern.

## **1.3 Die Birke und ihre Inhaltsstoffe**

### **1.3.1 Die Birke als Nutz- und Heilpflanze in der Geschichte**

Seit mehreren tausend Jahren begleitet die Birke den Menschen als Nutz- und Heilpflanze. Es gibt Hinweise darauf, dass bereits in der Altsteinzeit vor über 40000 Jahren Birkenteer aus Birkenrinde gewonnen wurde und als Klebstoff und Dichtungsmaterial Anwendung fand [16]. Einen Beleg für die Herstellung von Gefäßen aus Birkenrinde liefert die Mumie, welche im Jahre 1991 in den Öztaler Alpen gefunden wurde. Nahe dem Leichnam, der auf ein Alter von ca. 5250 Jahren geschätzt wird, wurden zwei zylindrische Behälter aus Birkenrinde gefunden, die mutmaßlich als Transportbehältnis für glühende Holzkohle dienten [17]. Zu den weiteren Fundstücken zählen auch Reste von Birkenporlingen, welche vermutlich aufgrund ihrer desinfizierenden Wirkung als Medikation für Magenbeschwerden benutzt wurden [17]. Des Weiteren wurde Birkenrinde von Amerikanischen Ureinwohnern für den Bau von Kanus [18] und als Baumaterial für Dächer benutzt. Beim Bau von Kanus, Dächern und der Herstellung von Gefäßen machte man sich schon damals die wasserabweisenden Eigenschaften der Birkenrinde zunutze. Heute weiß man, dass ein hoher Gehalt an lipophilen Triterpenen (hauptsächlich Betulin) in der Birkenrinde für dieses Verhalten verantwortlich ist [19]. Der hohe Gehalt an ätherischem Öl macht die Birkenrinde heute wie früher zu einem beliebten Zundermaterial. Außer der Rinde werden auch die Blätter der Birke genutzt. Als traditionelles Heilmittel kann daraus ein Tee zur Entwässerung zubereitet werden [20]. Das Birkenwasser, welches im Frühjahr direkt vom Baum abgezapft werden kann, wird getrunken oder über den enthaltenen Zucker zu Birkenwein vergoren [21]. Die wohl wichtigsten Branchenzweige zur Nutzung der Birke sind heutzutage die Papier- und Holzindustrie [22].

### **1.3.2 Die Birke und ihre Inhaltsstoffe im Fokus der Wissenschaft**

Den Startschuss für die wissenschaftliche Erforschung der Birke gibt Lowitz im Jahr 1788. Durch Sublimation am offenen Feuer gelingt es ihm Betulin aus der Birkenrinde zu isolieren [23]. Betulin ist somit eines der ersten Triterpene, das aus Pflanzenmaterial gewonnen wird [19]. Bereits 1839 postuliert Hess eine weitgehend korrekte Summenformel für Betulin [24]. Eine eingehendere Analyse des Betulins, einschließlich eines Extraktionsverfahrens für Betulin aus Birkenrinde, wird 1876 von

Hausmann durchgeführt [25]. Brünger liefert 1932 eine Übersichtsarbeit, in welcher zahlreiche chemische Reaktionen, Umlagerungen, Derivatisierungen sowie weitere Versuche für die Aufklärung der Struktur von Betulin beschrieben werden [26].

Nachdem fast 200 Jahre lang die Erforschung der physikochemischen Eigenschaften der Birkeninhaltsstoffe im Vordergrund steht, rücken während der letzten 50 Jahre die pharmakologischen Effekte der im Birkenkork enthaltenen Triterpene immer weiter in den Fokus der Forschung. Neben Betulin werden unter anderem auch Betulinsäure, Oleanolsäure, Lupeol und Erythrodiol als Bestandteile der Birkenrinde identifiziert [27; 28]. Dabei handelt es sich um pentazyklische Triterpene mit Lupan- und Oleanan-Grundgerüst, die sich in ihrer Substitution an C-Atom 17 unterscheiden (Abbildung 1).

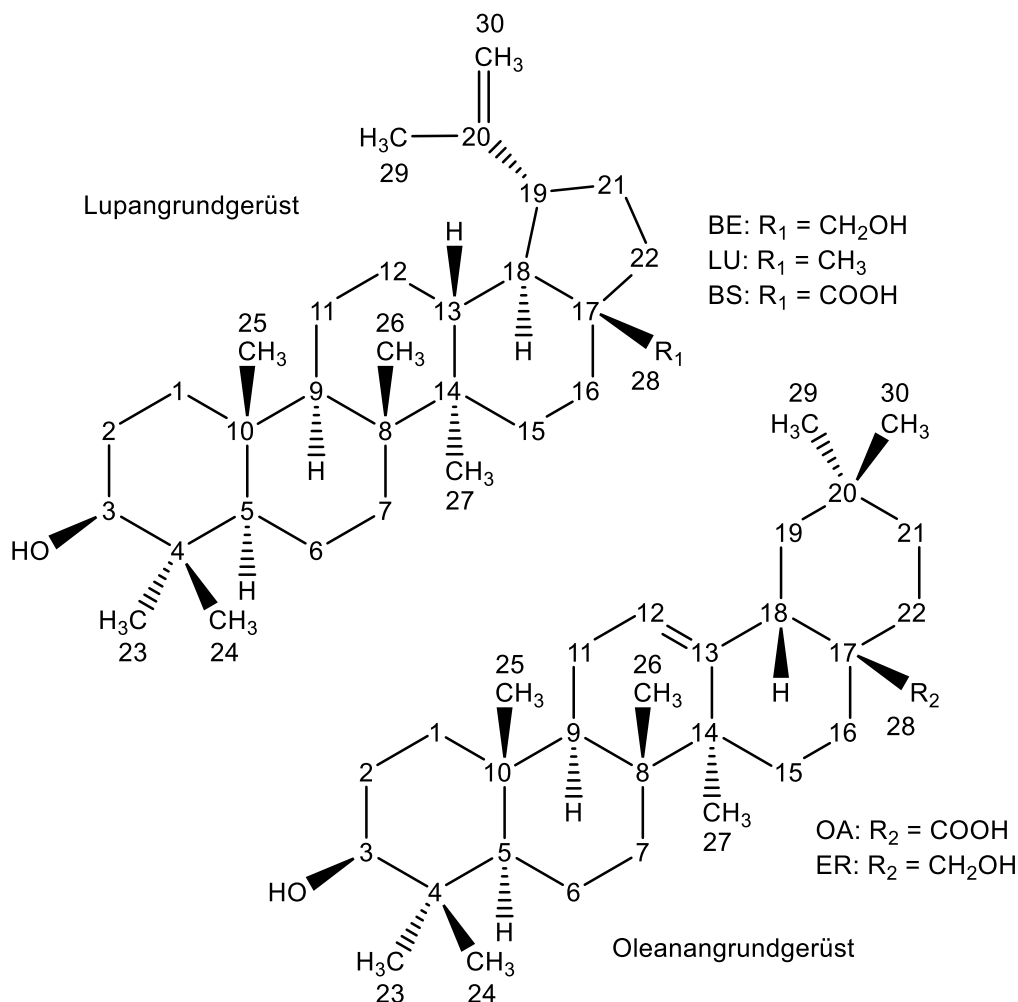


Abbildung 1: Strukturformeln pentazyklischer Triterpene aus Birkenkork (BE=Betulin; LU=Lupeol; BS=Betulinsäure; OA=Oleanolsäure; ER=Erythrodiol)

Für die einzelnen Triterpene und ihre Derivate werden in den letzten Jahren zahlreiche pharmakologische Effekte nachgewiesen. Tabelle 1 zeigt eine Zusammenstellung der verschiedenen Anwendungsgebiete.

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Tabelle 1: Pharmakologische Effekte von Triterpenen aus Birkenkork (modifiziert nach Laszczk 2007)

<b>Pharmakologische Effekte</b>	<b>Literatur zur pharmakologischen Wirkung von Triterpenen (und deren Derivaten*) aus Birkenkork</b>
antibakteriell, antiviral, antiparasitär	BE: [5; 29]; BS(*): [30-32]; BE/BS: [33; 34]; BE/BS/OS: [35]; LU/BS: [36]; OS/BS: [37]
hepatoprotektiv	BE: [38]; BE/BS: [39]; OS: [40-43]; LU: [44]; BS: [45]
antitumoral	BE: [46; 47]; BS: [48; 49] BE/BS(*): [50; 51]; LU: [52]; OS: [41; 42; 53]
wundheilungsfördernd	Extrakt: [6-8]; BS: [54]; OS: [55; 56]
antiinflammatorisch	BE: [5; 57]; LU: [58; 59]; OS: [41; 60]

Abgesehen vom Einsatz der Triterpene als Wirkstoffe, ist ein Extrakt aus Birkenkork in der Lage, Gele mit lipophilen Flüssigkeiten auszubilden und Cremes als Pickering Emulgator zu stabilisieren [2; 4; 61]. Diese Entdeckung führt 2003 zu einer Patentanmeldung [4] und zur Vermarktung der Imlan Serie als medizinische Hautpflege. Die antimikrobiellen Eigenschaften des Extraktes machen dabei eine zusätzliche Konservierung überflüssig, und es gelingt auch ohne den Einsatz von Emulgatoren eine stabile Zubereitung herzustellen. Somit sind zwei potentiell hautreizende und Allergien auslösende Faktoren eliminiert. Dies führt zu Produkten mit einer guten dermatologischen Verträglichkeit. Der wundheilungsfördernde Effekt des Birkenkorkextraktes eröffnet eine zusätzliche Anwendungsmöglichkeit auf oberflächlichen Wunden. Anfang 2016 wird das Produkt Episalvan Gel EU-weit für diese Indikation zugelassen. Es wird angenommen, dass der eingesetzte Extrakt die Neubildung und Wanderung von Keratinozyten beschleunigt und somit die Reepithelisierung der verletzten Haut fördert [7; 8].

Zur Gewinnung von Birkenkorkextrakt stehen heute zahlreiche Methoden zur Verfügung. Die von Lowitz beschriebene Sublimationsmethode ist das erste erfolgreiche Verfahren zur Isolierung von Triterpenen aus Birkenkork. In der modernen Wissenschaft spielt die Sublimation immer noch eine Rolle. Im Jahr 2003 veröffentlichten Guidoina et al eine Arbeit über die Gewinnung von Betulin aus Birkenrinde mittels Sublimation unter Vakuum und bei Umgebungsdruck [62]. Eine der

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

einfachsten und kostengünstigsten Methoden zur Extrakterstellung ist die Extraktion von Birkenrinde mit organischen Lösemitteln. In der Geschichte der Erforschung der Birke werden dazu zahlreiche Methoden beschrieben [26]. Aufgrund der Lipophilie der Triterpene kommen dabei überwiegend unpolare Lösemittel zum Einsatz. Neben Ethanolgemischen sind dies vor allem langkettige aliphatische Kohlenwasserstoffe. So wird beispielsweise der Extrakt, der als Ausgangsstoff für die Imlan Serie benutzt wird, mit Heptan extrahiert [2]. Eine weitere Methode zur Gewinnung von Birkenkorkextrakt, welche in der Literatur beschrieben wird, ist die Ultraschallextraktion [63]. All diesen Methoden ist gemein, dass entweder hohe Temperaturen und / oder organische Lösemittel eingesetzt werden müssen. Wie unter 1.1 beschrieben, bringt dies einige Nachteile mit sich, die durch die Extraktion mit überkritischen Fluiden umgangen werden können.

## 1.4 Überkritische Fluide

### 1.4.1 Geschichte und Einsatzgebiete überkritischer Fluide

Die Erforschung überkritischer Fluide nimmt ihren Anfang im Jahr 1822, als es De la Tour gelingt, die Phasengrenze von Lösemitteln zwischen der flüssigen und der gasförmigen Phase oberhalb einer bestimmten Temperatur verschwinden zu lassen [64]. Der Begriff des kritischen Punktes wird 1869 von Andrews eingeführt, der bei Versuchen mit Kohlendioxid feststellt, dass sich oberhalb einer bestimmten Temperatur das Gas durch Druckerhöhung nicht mehr verflüssigen lässt. Die Abhängigkeit dieses Punktes von Druck, Temperatur und Dichte geht ebenfalls auf Andrews zurück [65]. Eine mathematische Beschreibung des überkritischen Zustandes liefert Van der Waals 1873 [66]. Mit Hilfe der Van-der-Waals-Zustandsgleichung lassen sich dabei kritische Zustandsgrößen abschätzen (1.4.3, Formel 1). Erste Experimente zur Lösungskapazität von überkritischen Fluiden werden 1879 durchgeführt [67]. Den großen Einfluss der Dichte auf das Lösevermögen überkritischer Fluide entdeckt Tyrer 1910 [68]. Neben der Fraktionierung von Ölen, rückt die Extraktion von Pflanzeninhaltsstoffen immer mehr in den Vordergrund. Seit den 1970er Jahren wird die Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub> industriell für die Entkoffeinierung von Kaffee und die Herstellung von Hopfenextrakt genutzt [69; 70]. Wichtige Übersichtsarbeiten zur Extraktion liefern Stahl 1987 [71], Modey 1996 [72] und Kaiser 2001 [73].

Abgesehen vom Einsatz bei der Extraktion von Pflanzenstoffen werden überkritische Fluide als Fließmittel für die HPLC [74-76] und als Reaktionsmedium für chemische Reaktionen [77-79] eingesetzt. Im Fokus der Forschung steht seit etwa 25 Jahren auch die Mikronisierung und das Partikeldesign von pharmazeutischen Wirkstoffen zur Löslichkeitsverbesserung [79-81]. Dabei kommt der Partikelabscheidung aus überkritischer Lösung besondere Bedeutung zu. Unter anderem kommen dabei das RESS- (Rapid Expansion of Supercritical solutions) und CPD- (Controlled Particle Deposition) Verfahren zum Einsatz [82]. Eine weitere Anwendung überkritischer Fluide ist die Sterilisation von biologischem Material. Die milden kritischen Bedingungen bei der Verwendung von CO<sub>2</sub> als Medium ermöglichen es dabei auch empfindliche Materialien wie beispielsweise Totimpfstoffe zu sterilisieren [83]. In den letzten Jahren haben auch die überkritische Trocknung [84] und die Aerogelherstellung mit Hilfe

überkritischer Fluide [85] an Bedeutung gewonnen. Bei beiden Verfahren macht man sich zunutze, dass während des Trocknungsprozesses keine Phasengrenze im herkömmlichen Sinne überschritten werden muss, dadurch keine sprunghaften Zustandsänderungen zu überwinden sind und somit schonende Bedingungen herrschen.

## 1.4.2 Eigenschaften von überkritischem Kohlendioxid

Der kritische Punkt von Kohlendioxid liegt bei einer Temperatur von 31,0 °C und einem Druck von 73,8 bar. Verglichen mit anderen Gasen, die für die Extraktion im überkritischen Bereich in Frage kommen, bietet Kohlendioxid einige Vorteile (Tabelle 2). Die niedrige kritische Temperatur von CO<sub>2</sub> ermöglicht eine schonende Extraktion, selbst von thermolabilen Inhaltsstoffen. Der kritische Druck liegt, verglichen mit anderen Gasen, im oberen Bereich, ist aber mit moderner Hochdrucktechnik leicht zu realisieren. Methan und Ethan, als die zwei niedersten Alkane, bieten ähnlich milde Bedingungen am kritischen Punkt, sind im Gegensatz zu CO<sub>2</sub> aber brennbar und explosionsgefährlich. Weitere Vorteile von CO<sub>2</sub> gegenüber anderen Gasen sind die günstige Verfügbarkeit, das geringe toxische Potential und die Umweltfreundlichkeit.

*Tabelle 2: Daten kritischer Punkte verschiedener Gase [86]*

<b>Substanz</b>	<b>Kritische Temperatur [°C]</b>	<b>Kritischer Druck [bar]</b>
Methan	-82,5	46,4
Ethan	32,3	48,8
Propan	96,9	42,6
Butan	152,0	38,0
Kohlendioxid	31,0	73,8
Propylen	91,6	46,1
Ammoniak	132,4	113,0

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Kohlendioxid kann aufgrund seines linearen und symmetrischen Aufbaus, und damit fehlenden permanenten Dipols, als unpolares, aprotisches Lösemittel angesehen werden. Die hohe Lipophilie des Kohlendioxids zeigt sich auch in einer Dielektrizitätskonstante  $\epsilon$  kleiner 1,6 [87]. Somit liegt  $\text{CO}_2$  in einem ähnlichen Bereich wie Hexan ( $\epsilon = 1,9$ ) [88]. Wasser als polares Lösemittel liegt zum Vergleich bei einer Dielektrizitätskonstante von  $\epsilon = 80,3$  [89]. Für die Extraktion lipophiler, pentazyklischer Triterpene aus der Birkenrinde ist überkritisches  $\text{CO}_2$  also theoretisch gut geeignet.

### 1.4.3 Thermodynamische und physikalische Betrachtungen des überkritischen Zustandes mit Fokus auf die Anwendung bei der Extraktion

Betrachtet man das Phasendiagramm eines Stoffes, so markiert der kritische Punkt das Ende der Dampfdruckkurve (Abbildung 2). Um den überkritischen Zustand zu erreichen, muss man also sowohl die kritische Temperatur als auch den kritischen Druck überschreiten. Dabei kommt es nicht, wie bei Phasenübergängen zwischen fest, flüssig und gasförmig, zu einer plötzlichen Änderung der Eigenschaften des Stoffes, sondern zu einem kontinuierlichen Übergang.

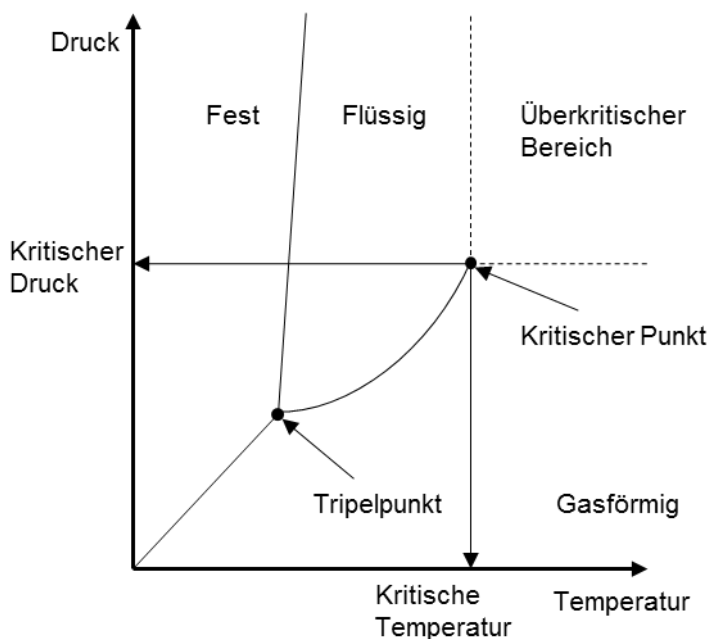


Abbildung 2: Schematisches Phasendiagramm von Kohlendioxid

Wie unter 1.4.1 beschrieben, geht die Entdeckung des Verschwindens der Phasengrenze oberhalb eines bestimmten Drucks und einer bestimmten Temperatur auf Forschungsergebnisse aus der Mitte des 19. Jahrhunderts zurück. Erste



Möglichkeiten den überkritischen Zustand mathematisch zu erfassen gab es ebenfalls noch während dieser Epoche. Im Jahr 1873 veröffentlicht Van der Waals, abgeleitet von der idealen Gasgleichung, eine Formel für die Beschreibung des Zustandes realer Gase (Formel 1).

$$p(V) = \frac{nRT}{V - nb} - a \left(\frac{n}{V}\right)^2$$

Formel 1: Van-der-Waals-Zustandsgleichung

$R$  = allgemeine Gaskonstante [ $J/(mol \cdot K)$ ]

$T$  = absolute Temperatur [ $K$ ]

$p$  = Druck des realen Gases [ $Pa$ ]

$a$  = Kohäsionsdruck [ $Pa \cdot m^6/mol^2$ ]

$b$  = Kovolumen [ $m^3/mol$ ]

$V$  = Volumen [ $m^3$ ]

$n$  = Stoffmenge [ $mol$ ]

Basierend auf dieser Formel lässt sich ein Druck- / Volumen-Diagramm erstellen (Abbildung 3). Beim Durchlaufen von Isothermen unterhalb des kritischen Punktes kommt es zu sogenannten Van-der-Waals-Schleifen.

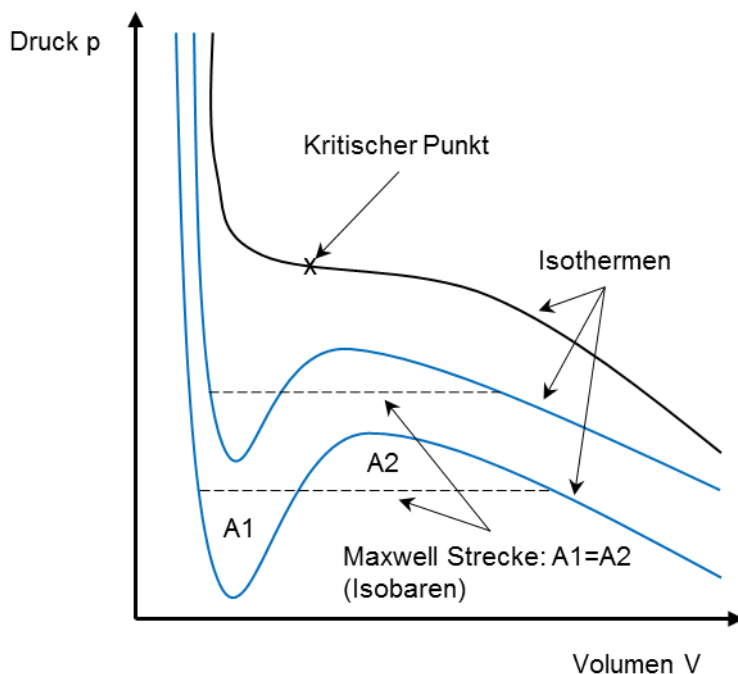


Abbildung 3: Schematisches  $p/V$ -Diagramm eines überkritischen Fluids nach van der Waals mit Van-der-Waals-Schleifen (blau)

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Die entstehenden Minima und Maxima haben zur Folge, dass auf einer Isobaren der jeweiligen Isothermen mehrere Volumina zugeordnet sind. Um diese metastabilen Zustände im Phasenübergangsbereich zu beschreiben, kann die Maxwell Strecke herangezogen werden. Sie teilt entlang einer Isobaren die Flächen im Bereich des Wendepunktes in zwei gleich große Teile und stellt somit den tatsächlichen Phasenübergang dar. Als Beleg für die Existenz der überkritischen Phase kann das Verschwinden dieses Phasenübergangs oberhalb der kritischen Isothermen angesehen werden. Über die Ableitungen der Funktion kann der Sattelpunkt berechnet werden, und die kritischen Parameter können somit abgeschätzt werden.

Will man überkritische Fluide für Extraktionsvorgänge nutzen, so lohnt sich ein Blick auf das Massentransportverhalten, welches mit dem ersten Fick'schen Diffusionsgesetz beschrieben werden kann (Formel 2). Neben dem Konzentrationsgefälle, spielt auch der Diffusionskoeffizient eine entscheidende Rolle. Über die Einstein-Smoluchowski-Beziehung wird der Diffusionskoeffizient definiert (Formel 3).

$$J = -D * \frac{dc}{dx}$$

*Formel 2: Erstes Fick'sches Diffusionsgesetz*

$J$  = Teilchenstromdichte [mol/(m<sup>2</sup>\*s)]

$D$  = Diffusionskoeffizient [m<sup>2</sup>/s]

$dc/dx$  = Konzentrationsgradient [mol/m<sup>4</sup>]

$$D = \mu * k_B * T$$

*Formel 3: Einstein-Smoluchowski-Beziehung*

$D$  = Diffusionskoeffizient [m<sup>2</sup>/s]

$\mu$  = Beweglichkeit der Teilchen [s/kg]

$k_B$  = Boltzmann-Konstante [J/K]

$T$  = Temperatur [K]

Für kleine Reynolds-Zahlen entspricht die Beweglichkeit  $\mu$  dem Kehrwert des Strömungskoeffizienten  $\gamma$ . Aus der Stokes-Gleichung ergibt sich somit für kugelförmige Teilchen:

$$\mu = \frac{1}{6\pi * \eta * r}$$

Formel 4: Beweglichkeit kugelförmiger Teilchen nach Stokes

$\mu$  = Beweglichkeit der Teilchen [s/kg]

$\eta$  = dynamische Viskosität [Pa\*s]

$r$  = Teilchenradius [m]

Zusammengefasst in der Stokes-Einstein-Gleichung ergibt sich die Abhängigkeit des Diffusionskoeffizienten von der Temperatur, der Viskosität des Mediums und der Größe der Teilchen. Betrachtet man den Diffusionskoeffizienten von CO<sub>2</sub> im überkritischen Zustand (Tabelle 3), so fällt auf, dass der Wert zwischen dem des flüssigen- und des gasförmigen CO<sub>2</sub> liegt. Hier wird einmal mehr deutlich, dass es sich bei der überkritischen Phase um einen Mischzustand zwischen flüssig und gasförmig handelt. Die im überkritischen Bereich vorherrschende Dichte kann je nach Bedingungen ähnliche Werte annehmen, wie dies in der Flüssigphase der Fall ist. Da das Lösevermögen stark von der Dichte abhängt [68] und mit zunehmender Dichte größer wird, sind überkritische Fluide eine interessante Alternative zu organischen Lösemitteln.

Tabelle 3: Vergleich physikalischer Parameter in der flüssigen, gasförmigen und überkritischen Phase [12]

	<b>Gasförmig</b>	<b>Überkritisch</b>	<b>Flüssig</b>
Diffusionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /s]	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-3</sup> -10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-6</sup>
Dichte [g/cm <sup>3</sup> ]	10 <sup>-3</sup>	0,4-0,9	1
Dynamische Viskosität [Pa*s]	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-4</sup> -10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-3</sup>

Ebenfalls von Bedeutung für die Extraktion ist die Viskosität (Formel 4). Die Viskosität in der überkritischen Phase ähnelt der des gasförmigen Zustandes. Gepaart mit einem hohen Diffusionskoeffizienten ermöglicht die geringe Viskosität ein leichtes Eindringen in Materialien, was für die Extraktion förderlich sein sollte.

### **1.4.4 Partikelabscheidung aus überkritischer Lösung**

Sowohl bei der Herstellung von Extrakten als auch beim Design von Pulverpartikeln sind die Eigenschaften des Produktes stark von der Art der Partikelabscheidung aus überkritischer Lösung abhängig. Üblicherweise wird bei der klassischen Pflanzenextraktion die überkritische Lösung über ein Ventil in einen Behälter entspannt, in dem unterkritische Bedingungen entlang der Siedepunktkurve herrschen. Hierbei entsteht eine flüssige Phase, in der sich der Extrakt anreichert, sowie eine Gasphase, über welche das Extraktionsgas zurückgewonnen werden kann. Die Partikelabscheidung erfolgt durch Entspannen des Druckbehälters. Hier herrschen oft unkontrollierte Bedingungen vor, die wenig Einfluss auf den Abscheideprozess zulassen.

Im Bereich des Partikeldesigns gibt es mehrere Möglichkeiten Partikel gezielt abzuscheiden. Beim sogenannten CPD-Verfahren (Controlled Particle Deposition) können beispielsweise Pulver oder poröse Tabletten mit Wirkstoff beladen werden. Hierbei befinden sich Trägermaterial und Wirkstoff im selben Druckbehälter. Nach Beaufschlagen mit überkritischem Fluid und einer ausreichenden Equilibrierungszeit, während der die überkritische Lösung in das Trägermaterial eindringt, können die Partikel direkt im Pulverbett oder den Tabletten abgeschieden werden. Durch das Ausfallen des Wirkstoffes im Trägermaterial können sehr feine Partikel erzeugt werden und weitere Prozessschritte umgangen werden, bei denen eventuell Probleme durch die Handhabung des feinpartikulären Wirkstoffs entstehen könnten [11]. Für die Anwendung des CPD-Verfahrens muss der Wirkstoff eine sehr gute Löslichkeit im überkritischen Fluid aufweisen, da nur ein begrenztes Volumen zur Verfügung steht.

Alternativ können im RESS-Verfahren (Rapid Expansion of Supercritical Solutions) Partikel im Mikro- bis Nanometerbereich produziert werden [90-92]. Dabei wird die überkritische Lösung bei Umgebungsdruck oder moderatem Gegendruck direkt in die Gasphase verdüst. Durch den schlagartigen Abfall des Druckes und der Dichte verliert das Fluid sein Lösevermögen und sehr feine Partikel präzipitieren. Problematisch bei diesem Verfahren kann der durch den Joule-Thomson-Effekt bedingte Temperaturabfall im Düsenbereich sein (1.4.5). (Trocken-) Eisbildung im Produkt oder ein Verstopfen der Düse können die Folgen sein. Durch die große Oberflächenenergie und die elektrostatische Aufladung des feinen Pulvers, kann die Weiterverarbeitung unter Umständen ebenfalls problembehaftet sein [82]. Um die Partikel zu konservieren,

können sie auch in ein wässriges, eventuell mit Tensid stabilisiertes Medium versprüht werden, um eine Suspension zu erhalten [93; 94].

Sowohl die Extraktion als auch das CPD- und das RESS-Verfahren basieren auf der Auflösung von Substanzen im überkritischen Fluid. Im Gegensatz dazu gibt es auch einige Methoden, die das Fluid als Nichtlösemittel nutzen. Ein klassisches Beispiel aus dem Bereich der Extraktion ist das Entkoffeinieren von Kaffee, bei dem der ungewünschte Bestandteil Koffein mittels Extraktion entfernt wird und koffeinfreier Kaffee als Rückstand bleibt [69]. Auch im Bereich Partikeldesign werden überkritische Fluide als Nichtlösemittel angewendet. Das Grundprinzip dabei ist es, eine Lösung des Arzneistoffes in einem organischen Lösemittel mit einem überkritischem Fluid in Kontakt zu bringen. Löst sich das organische Lösemittel im Fluid, nicht aber der Arzneistoff, so kann das Lösemittel entfernt werden und zurück bleiben die ausgefallenen Arzneistoffpartikel. Das Mischen von organischer Lösung und überkritischem Fluid kann in einem Reaktor erfolgen (SAS: Supercritical Anti Solvent), durch Versprühen der organischen Lösung in einen Behälter, der mit einem sc Fluid durchströmt wird (ASES: Aerosol Spray Extraction System), oder durch gemeinsames Versprühen beider Lösungen mittels einer Zweistoffdüse (SEDS: Solution Enhanced Dispersion by Supercritical Fluids) [95].

### **1.4.5 Der Joule-Thomson-Effekt**

Wie unter 1.4.4 beschrieben, führt die Abkühlung bedingt durch die Expansion des überkritischen Fluids beim Versprühen überkritischer Lösungen zu Problemen. Dies kann sowohl die Prozessführung bei der Herstellung als auch das Produkt negativ beeinflussen. Allgemein beschreibt der Joule-Thomson-Effekt die Temperaturänderung eines Gases bei isenthalper Volumenänderung. Erstmals beschrieben wird das Phänomen 1852 von James Prescott Joule und William Thomson [96]. Der Temperaturabfall bei der Expansion eines Gases geht auf die gegenseitige Anziehung der Gasmoleküle zurück, welche bei einer Vergrößerung des Volumens überwunden werden muss. Die dafür benötigte Energie stammt aus der Umgebung, also aus der Bewegung der Moleküle, was wiederum einen Temperaturabfall zur Folge hat.

## 1.5 Rheologische Charakterisierung halbfester Zubereitungen

### 1.5.1 Definition und Klassifizierung halbfester Zubereitungen

Um Wirkstoffe lokal auf der Haut zu applizieren oder über die Haut zur Resorption zu bringen, stehen einige Darreichungsformen zur Verfügung. Das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur. 9.2) fasst diese unter „halbfeste Zubereitungen zur kutanen Anwendung“ zusammen. Unter diesen Begriff fallen Salben, Cremes, Gele, Pasten, Umschlagpasten und wirkstoffhaltige Pflaster. Ist ein Wirkstoff enthalten, so kann dieser in der Grundlage gelöst oder suspendiert vorliegen. Da die Grundlage die Wirkstofffreisetzung beeinflussen kann, außerdem für die Stabilität der Zubereitung verantwortlich ist und zusätzlich pflegende Eigenschaften haben kann, ist die Auswahl einer geeigneten Grundlage mitentscheidend für den Therapieerfolg.

Eine Einteilung halbfester Grundlagen kann unter anderem nach dem Gesichtspunkt der Phasenanzahl erfolgen. Dabei kann zwischen ein- und mehrphasigen Systemen unterschieden werden. Einphasige Systeme wie Salben und Gele stehen mehrphasigen Systemen wie Cremes gegenüber.

Salben sind wasserfreie Grundlagen und bestehen aus einer kohärenten hydrophoben (z.B. Kohlenwasserstoffe, Wachse) oder hydrophilen (Macrogole) Phase. Sind Emulgatoren eingearbeitet, so entsteht eine wasseraufnehmende Salbe, die durch Einarbeitung von Wasser zu einer Creme weiterverarbeitet werden kann.

Bei Cremes handelt es sich um zwei- bis mehrphasige Grundlagen aus einer kohärenten äußeren Phase und einer dispergierten Innenphase. Je nach Phasenlage spricht man von einer W/O-Creme (Wasser in Öl), sollte die lipophile Phase die äußere bilden, oder von einer O/W-Creme (Öl in Wasser), bei einer zusammenhängenden hydrophilen Außenphase. Diese Einteilung legt für Cremes eine emulsionsartige, für die Innenphase tröpfchenförmige Beschaffenheit zu Grunde. Der tatsächliche Aufbau ist allerdings häufig wesentlich komplexer und kann sowohl micellare als auch lamelare Strukturen aufweisen. Um eine stabile Creme zu erhalten, muss die Grenzflächenspannung zwischen hydrophiler und lipophiler Phase gesenkt werden. Am häufigsten kommen dabei klassische Emulgatoren in Form von gelösten amphiphilen Molekülen zum Einsatz. Einen Sonderfall stellen die nach ihrem

Entdecker benannten Pickering-Emulsionen dar. An der Grenzfläche zwischen den Phasen lagern sich hier Feststoffpartikel an, die eine mechanische Barriere bilden [97].

Von einem Gel spricht man üblicherweise, wenn eine Flüssigkeit mithilfe einer inneren Matrix stabilisiert und verfestigt wird. Diese dreidimensionale Netzwerkstruktur kann über verschiedene intermolekulare und interpartikuläre Kräfte gebildet werden (z.B. Wasserstoffbrücken, van-der-Waals-Kräfte). Gele können anhand ihrer Außenphase in Hydrogele und Oleogele eingeteilt werden. Hydrogele bestehen aus einer wässrigen Außenphase, die mit makromolekularen Substanzen (z.B. (Carboxy-) Methylcellulose, Polyacrylsäure) verfestigt wird. Das lipophile Pendant dazu stellen Oleogele dar. Hier bilden Oleogelbildner wie z.B. Aerosil oder TE die Matrix und stabilisieren so Öle oder flüssige Wachse.

### **1.5.2 Birkenkorkextrakt als Emulgator und Gelbildner**

Wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben, ist ein triterpenhaltiger, aus der Birkenrinde gewonnener Trockenextrakt in der Lage Gele und Cremes zu stabilisieren. Da auf zusätzliche Konservierung und den Einsatz klassischer Emulgatoren verzichtet werden kann, bieten diese Arten von halbfesten Zubereitungen einige Vorteile. In einer Arbeit von Grysko im Jahr 2011 wird ein Netzwerk aus TE-Partikeln als strukturgebendes Element für die Gelbildung beschrieben [2]. Für den Zusammenhalt der Matrix werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Partikeloberflächen verantwortlich gemacht [2]. Bei der Stabilisierung von Cremes wird sowohl eine Fixierung des Wassers im Gelgerüst vorgeschlagen als auch die Funktion der Extraktpartikel als Pickering-Emulgator [2].

### **1.5.3 Rheologie halbfester Zubereitungen**

Da halbfeste Zubereitungen ein nicht Newtonsches Fließverhalten aufweisen und deren Viskosität somit von der Scherbeanspruchung abhängt, muss die Messmethodik so angepasst sein, dass das komplexe Fließverhalten charakterisiert werden kann. Salben, Cremes und Gele zeigen plastisches Fließverhalten mit Casson-Charakteristik. Das bedeutet, dass sie sich bis zu einer gewissen Scherbelastung weitgehend formstabil verhalten. Oberhalb dieser Fließgrenze, die bei halbfesten Zubereitungen nicht scharf ausgeprägt sein muss, kommt es zu pseudoplastischem

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

Fließen. Mit zunehmender Scherung nimmt also die Viskosität geringere Werte an. Als Ausnahme im Bereich halbfester Zubereitungen sind dilatante Pasten zu nennen. Hier nimmt die Viskosität aufgrund erhöhter innerer Reibung zwischen den Partikeln bei steigender Scherrate zu.

### 1.5.4 Rheologische Vermessung halbfester Zubereitungen

Gängige Geräte zur Charakterisierung des Fließverhaltens halbfester Zubereitungen sind Rheometer mit einer Platte-Platte oder einer Kegel-Platte Messgeometrie. Ein Vorteil des Kegel-Platte Setups ist die konstante Schergeschwindigkeit über den gesamten Messspalt. Bei einer Platte-Platte Anordnung wird der Gradient der Schergeschwindigkeit über den Spalt mit der Rabinowitsch-Weissenberg-Korrektur verrechnet [98]. Vermisst man Zubereitungen mit suspendierten Feststoffpartikeln, so bietet sich die Platte-Platte Methode an, um eine Verfälschung des Messergebnisses durch zusätzliche Reibung von Partikeln an der Kegelspitze zu umgehen. Neben einfachen Rotationsversuchen, bei denen lediglich die Schubspannung in Abhängigkeit vom Schergefälle (oder anders herum) bestimmt wird, können Oszillationsmessungen durchgeführt werden. Vor allem bei strukturviskosen Stoffen bietet sich diese Methode an, da mit dem Speichermodul  $G'$  und dem Verlustmodul  $G''$  zwei getrennte Materialfunktionen ausgegeben werden, um das elastische und viskose Verhalten der Probe zu beschreiben.

Für die Vermessung von Gelen und Cremes auf Basis von Triterpentrockenextrakten aus der Birke werden 2011 von Grysko Amplitudensweeps und 3-Intervall-Thixotropie-Tests durchgeführt [2]. Diese Methoden werden für die vorliegende Arbeit angepasst (s. Kap. 2.2.3.2).

#### 1.5.4.1 Amplitudensweep zur rheologischen Charakterisierung (AS)

Bei einem Amplitudensweep wird die Probe durch eine oszillierende Messung mit gleichbleibender Frequenz und steigender Deformationsamplitude untersucht. Nimmt man für eine Substanz rein elastisches Verhalten an, so schwingt die Schubspannung in Phase mit der Deformation. Bei rein viskosen Eigenschaften resultiert für die Sinuskurve eine Phasenverschiebung  $\delta$  von  $90^\circ$ . Visko-elastische Materialien weisen demnach eine Phasenverschiebung von  $0^\circ < \delta < 90^\circ$  auf [99]. Die Messungen liefern



Kurven für den Speichermodul ( $G'$ ) und den Verlustmodul ( $G''$ ). Der Verlauf der Speichermodulkurve repräsentiert das elastische Verhalten der Probe, während der Verlustmodul für die viskosen Eigenschaften steht. Elastisches Verhalten meint in diesem Sinne die Speicherung von Deformationsenergie, wohingegen die viskosen Eigenschaften durch Strukturabbau mit Energieverlust einhergehen. Abbildung 4 zeigt einen typischen Kurvenverlauf für die Vermessung einer strukturviskosen Zubereitung.

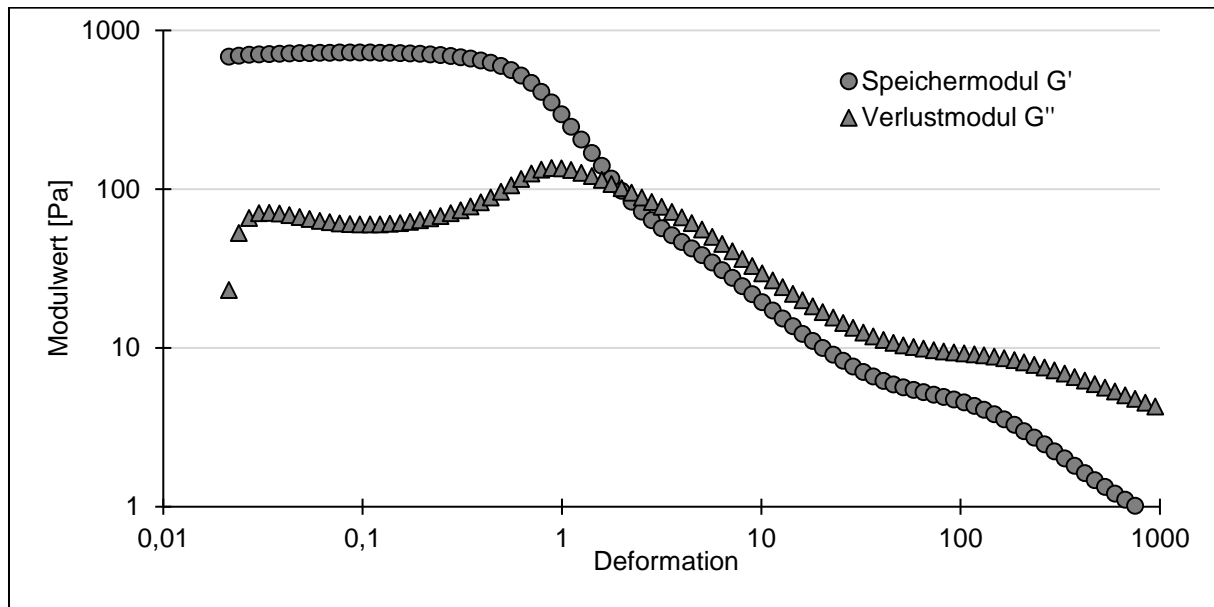


Abbildung 4: Verlauf eines Amplitudensweeps für eine Substanz mit strukturviskosem Verhalten

Im Bereich niedriger Deformation laufen Speicher- und Verlustmodul parallel. In diesem linear visko-elastischen Bereich (LVE) nimmt bei einer Probe mit typischem Gelcharakter der Speichermodul größere Werte als der Verlustmodul an. Das Verhalten der Probe wird also durch die elastischen Eigenschaften bestimmt. Mit zunehmender Deformation nähern sich die beiden Kurven aneinander an und es kommt, einhergehend mit einem inneren Strukturabbau, im sogenannten Cross-over Punkt zum Gel-Sol Übergang. An der Lage dieses Punktes kann die Stabilität der Substanz gegenüber Scherbelastung beurteilt werden. Die Höhe der (Speicher-) Modulwerte im LVE-Bereich kann als Maß für die Viskosität angesehen werden. Je höher die Werte liegen, desto ausgeprägter ist das elastische Verhalten. Als Quotient von Verlust- und Speichermodul kann der Verlustfaktor als weiteres Kriterium zur Beurteilung der rheologischen Eigenschaften dienen. Liegt der Quotient unter eins, so dominiert das elastische über das viskose Verhalten. Je weiter sich dieser Wert an null annähert, desto ausgeprägter ist die Diskrepanz zwischen elastischen und viskosen Eigenschaften und somit der Gelcharakter.

### 1.5.4.2 3-Intervall-Thixotropie-Test zur rheologischen Charakterisierung (ITT)

Im Vergleich zum Amplitudensweep, wird beim ITT die Scheramplitude nicht kontinuierlich erhöht, sondern während des ersten Intervalls konstant auf einer moderaten Scherstufe gehalten. Das zweite Intervall umfasst eine Scherrampe, ähnlich der des AS, um einen Strukturabbau mit Gel-Sol Übergang zu erreichen. Als drittes Intervall folgt wieder eine moderate Scherung bei konstanter Amplitude. In diesem letzten Abschnitt soll untersucht werden, in wie weit sich die ursprünglichen Geleigenschaften zurückbilden, also ob thixotropes Verhalten vorliegt. Die Bereiche in Abbildung 5, in denen  $G'$  und  $G''$  parallel verlaufen, markieren die Intervalle mit moderater Scherbelastung (Abschnitt 1 & 3). Bei 1150 s kommt es zum Cross-over und anschließend im dritten Intervall zu einer Regeneration der Gelstruktur mit einem  $G'$ -Wert, der über  $G''$  liegt. Das Ausgangslevel wird aber nicht mehr vollständig erreicht und  $G'$  im dritten Intervall bleibt unterhalb  $G'$  im ersten Abschnitt.

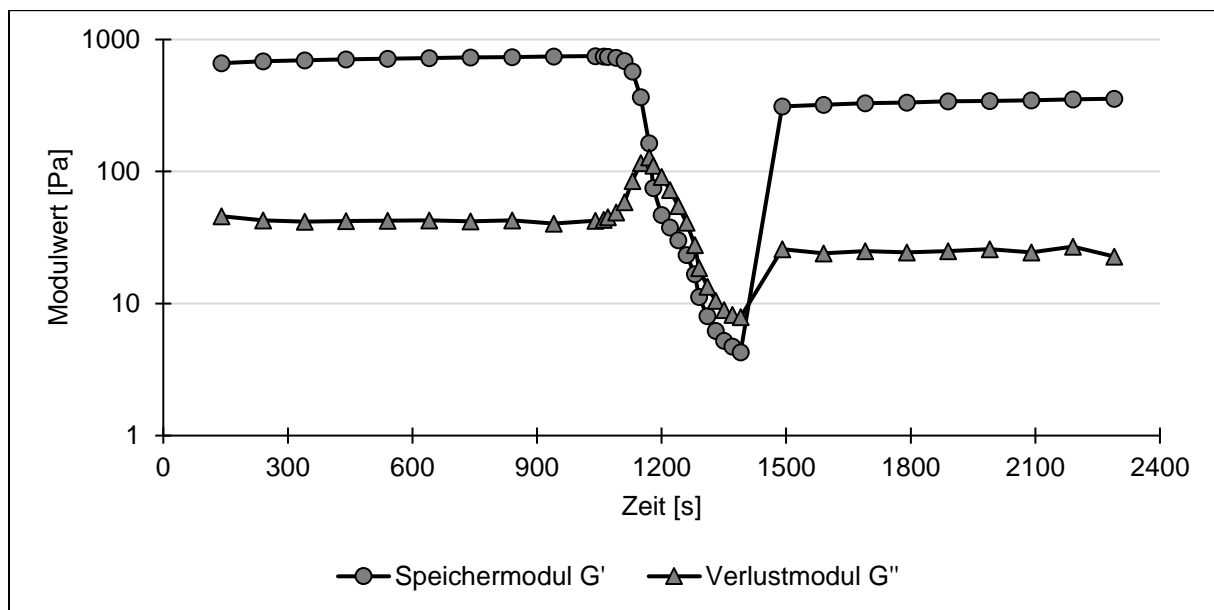


Abbildung 5: Verlauf eines ITT für eine Substanz mit strukturviskosem und partiell thixotropem Verhalten

## 1.6 Charakterisierung von Oberflächen

### 1.6.1 Bedeutung der Oberfläche von Triterpentrockenextrakten für die Herstellung halbfester Zubereitungen

Die Eigenschaften von Triterpentrockenextrakten, insbesondere für die Verwendung derselben zur Stabilisierung halbfester Zubereitungen, können stark von der Oberflächenbeschaffenheit der Extrakte abhängen. So wird von Laszczyk 2007 beschrieben, dass eine Lagerung von Triterpentrockenextrakten bei höheren Temperaturen zu einer Versinterung der Oberfläche, einhergehend mit deren Verkleinerung, führt [3]. Bei der darauf folgenden Gelherstellung wird die Oberfläche somit nicht mehr effektiv aufgebrochen und die agglomerierten Partikel können nicht in ihre Primärteilchen zerkleinert werden, was zu einer Abnahme der Gelbildungsfähigkeit führt [2; 3]. Im Jahr 2011 gelingt es Grysko durch Umkristallisation von Triterpentrockenextrakten deren Oberfläche zu verändern und anschließend Unterschiede im Gelbildungsverhalten nachzuweisen [2]. Eine Verkleinerung der spezifischen Oberfläche durch Umkristallisation mit Hilfe einer Soxhlet-Apparatur führt dabei zu einem schlechteren Gelbildungsverhalten, während eine Oberflächenvergrößerung durch das ASE-Verfahren (Accelerated Solvent Extraction) zu einer besseren Gelstabilisierung führt [2]. Diese Phänomene werden dadurch begründet, dass durch die veränderte Oberfläche die Anzahl außenständiger Hydroxylgruppen an der Partikeloberfläche variiert und sich somit die Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Extraktpartikeln über die unterschiedliche Anzahl möglicher Wasserstoffbrücken ändert [2]. Somit scheint die Bestimmung der spezifischen Oberfläche ein wichtiges Instrument zur Charakterisierung von Triterpenextrakten zu sein, wenn diese bei der Herstellung von Gelen und Cremes zum Einsatz kommen sollen. Als weiterer Parameter für die Charakterisierung von Oberflächen von Extrakten kann die Oberflächenenergie dienen. Sie könnte Aufschluss über die polaren und unpolaren Wechselwirkungen sowohl zwischen Extraktpartikeln als auch zwischen Extrakt und Grundlage liefern. In den folgenden Abschnitten wird daher auf die Messung der spezifischen Oberfläche nach der Methode von Brunauer, Emmet und Teller (BET) eingegangen, sowie auf die Bestimmung der Oberflächenenergie, insbesondere auf die Messung der dispersiven Oberflächenenergie mit inverser Gaschromatographie.

## 1.6.2 Die BET-Methode zur Bestimmung der spezifischen Oberfläche

Um die spezifische Oberfläche eines porösen Festkörpers oder eines Pulverbettes bestimmen zu können, kann die auf Gasadsorption beruhende BET-Methode angewendet werden. Sie wird erstmals 1938 von Brunauer, Emmet und Teller vorgestellt [100]. Bei der Messung wird ein Messgas (häufig Stickstoff) unterhalb seines Sättigungsdampfdrucks über das Probenmaterial geleitet. Die Messung muss bei sehr niedrigen Temperaturen stattfinden (beispielsweise in flüssigem Stickstoff bei  $-196\text{ °C}$ ), um eine ausreichende Interaktion zwischen Messgas und Probe sicherzustellen. Mithilfe der Adsorption-Desorptions-Isothermen ist es möglich, auf die adsorbierte und desorbierte Gasmenge zu schließen, welche proportional zur Oberfläche der Probe ist. Als mathematisches Modell zur Beschreibung der Gasadsorption als eine Funktion des Druckes, kann die BET-Gleichung herangezogen werden [100; 101]:

$$\frac{1}{X \left[ \left( \frac{P_0}{P} \right) - 1 \right]} = \frac{1}{X_m * K} + \frac{K - 1}{X_m * K} * \left( \frac{P}{P_0} \right)$$

*Formel 5: BET-Gleichung (nach Brunauer, Emmet und Teller 1938)*

$X$  = Adsorbierte Gasmenge [ $\text{m}^3$ ]

$X_m$  = Gasmenge einer monomolekularen Schicht [ $\text{m}^3$ ]

$K$  = Konstante zur Beschreibung der Interaktion zwischen Gas und Festkörper

$P/P_0$  = relativer Gasdruck

Vom Messgerät gelieferte Daten umfassen Wertepaare aus adsorbierter Gasmenge  $X$  und relativem Gasdruck  $P/P_0$ . Aus Formel 5 lässt sich eine Geradengleichung ableiten mit der Steigung  $m$  und dem Achsenabschnitt  $c$ :

$$m = \frac{K - 1}{X_m * K}; c = \frac{1}{X_m * K}$$

*Formel 6: Steigung  $m$  und Achsenabschnitt  $c$  abgeleitet aus der BET-Gleichung*

Gleichgesetzt und aufgelöst nach  $X_m$  ergibt sich:

$$X_m = \frac{1}{m + c}$$

*Formel 7: Berechnung des Gasvolumens einer monomolekularen Schicht*

Aus Steigung und Achsenabschnitt einer Geraden, die durch Regression mehrerer Wertepaare aus Druck und adsorbierter Gasmenge erhalten wird, kann somit das

Volumen einer monomolekularen Gasschicht auf der Probenoberfläche berechnet werden. Zur Bestimmung der Probenoberfläche wird nun die Molekülanzahl in der monomolekularen Schicht berechnet und diese mit dem Platzbedarf eines Moleküls multipliziert. Dieser Platzbedarf wird mit der sogenannten „cross-sectional area“  $A_m$  beschrieben.

$$A_t = \frac{X_m * L_{AV} * A_m}{M_V}$$

*Formel 8: Berechnung der Gesamtoberfläche einer BET Probe*

$A_t$  = Gesamtoberfläche der Probe [ $m^2$ ]

$X_M$  = Volumen einer monomolekularen Schicht [ $m^3$ ]

$L_{AV}$  = Avogadrozahl:  $6,022 * 10^{23}$  [1/mol]

$A_m$  = cross-sectional area: 0,162 [ $nm^2$ ]

$M_V$  = molares Volumen [ $m^3/mol$ ]

Um die spezifische Oberfläche zu erhalten, muss nun lediglich die Gesamtoberfläche der Probe auf eine bestimmte Gewichtsgröße normiert werden.

### 1.6.3 Messung der Oberflächenenergie mit inverser Gaschromatographie

Die freie Oberflächenenergie ist definiert als die Arbeit, die aufgewendet werden muss, um die Oberfläche eines (Fest-) Körpers zu vergrößern. Sie ist maßgeblich für das Verhalten bei Interaktion mit Gas- und Flüssigphasen verantwortlich. Zahlreiche Methoden zur Charakterisierung der Oberflächenenergie beruhen auf dem Zusammenhang zwischen Oberflächenenergie und Kontaktwinkel nach der Young'schen Gleichung:

$$\sigma_s = \sigma_{sl} + \sigma_l * \cos \theta$$

*Formel 9: Young'sche Gleichung*

$\sigma_s$  = freie Oberflächenenergie

$\sigma_{sl}$  = Grenzflächenspannung flüssig fest

$\sigma_l$  = Oberflächenspannung flüssig

$\theta$  = Kontaktwinkel

Die Messung des Kontaktwinkels kann über eine Tropfenkonturanalyse, mit Hilfe der Wilhelmy-Plattenmethode oder, falls es sich um Pulver handelt, mit der Washburn-Methode bestimmt werden. Für die Berechnung der Oberflächenenergie stehen

## 1 Einleitung, Zielsetzung und Allgemeine Grundlagen

mehrere Modelle zur Auswahl, die sich in der Interpretation der Wechselwirkung innerhalb und zwischen den Molekülen unterscheiden (Tabelle 4). Der dispersive (unpolare) Anteil der Oberflächenenergie kommt durch temporäre Verschiebungen der Elektronendichte im Molekül zustande, während permanente Dipole für die polaren (nach Fowkes als nicht-dispersiv nicht weiter spezifizierten) Wechselwirkungen verantwortlich sind.

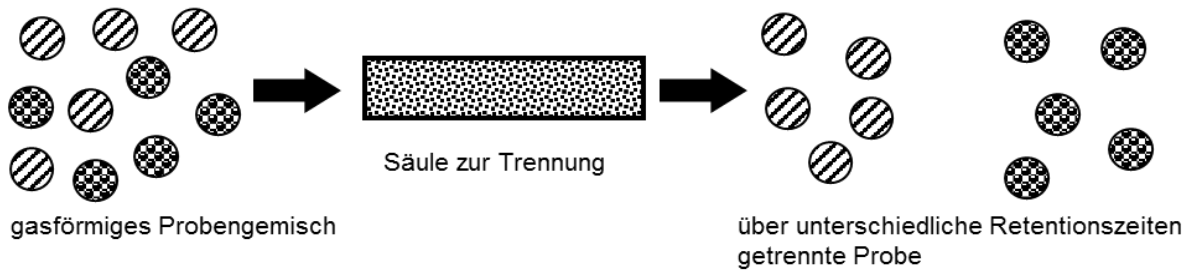
*Tabelle 4: Berechnungsmethoden zur Bestimmung der Oberflächenenergie*

<b>Auswertung nach</b>	<b>Wechselwirkungskomponenten</b>
Fowkes [102]	Dispersiv / Nicht-dispersiv
Owens-Wendt-Rabel-Kaelble [103-105] / Wu [106]	Dispersiv / Polar
Oss & Good [107]	Lewis Säure / Lewis Base

Der Zugang zur Oberflächenenergie über Kontaktwinkelmessungen hat vor allem für pulverförmige Proben entscheidende Nachteile. Bei der Tropfenkonturanalyse müssen Presslinge hergestellt werden. Dabei werden die Eigenschaften der Oberfläche unter Umständen wesentlich verändert. Bei der Washburn-Methode handelt es sich ebenfalls um eine nicht zerstörungsfreie Methode, denn hier kommt das Pulver in Kontakt mit einer Testflüssigkeit [108].

Diese Problematik kann durch die Bestimmung der Oberflächenenergie mit inverser Gaschromatographie (iGC) umgangen werden. Das Prinzip der inversen Gaschromatographie geht auf Forschung in den 1940er und 50er Jahren zurück, der Begriff wurde aber hauptsächlich von Kiselev im darauffolgenden Jahrzehnt geprägt [109; 110]. Der apparative Aufbau einer iGC-Anlage ähnelt stark dem eines analytischen Gaschromatographen. Allerdings sind die Funktion der mobilen und stationären Phase vertauscht. Während bei der klassischen Gaschromatographie eine gasförmige Probe über eine stationäre Trennsäule geleitet wird, so wird bei der inversen Gaschromatographie das Probenmaterial in Pulverform in eine Kapillare gepackt und dient als stationäre Phase. Über diese Kapillare werden verschiedene Testgase, häufig Alkane in homologer Reihe, geleitet. Die unterschiedlichen Retentionszeiten werden als Maß für die Wechselwirkung zwischen Probe und Gas genutzt (Abbildung 6).

Gaschromatographie in Qualitativer- und Quantitativer Analytik



Inverse Gaschromatographie in der Oberflächenanalytik

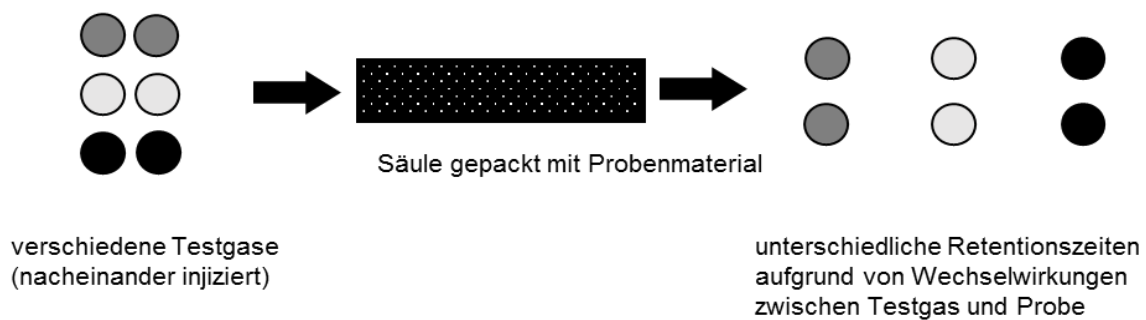


Abbildung 6: Gaschromatographische Prinzipien in verschiedenen Bereichen der Analytik

Der Auswertemethode nach Schultz liegt folgende Formel zu Grunde [111]:

$$R * T * \ln V_N = 2 * L_{AV} * A_m * \sqrt{\gamma_S^D * \gamma_L^D} + C$$

Formel 10: Formel zur Auswertung einer iGC-Messung nach Schultz

$R$  = allgemeine Gaskonstante [J/(mol\*K)]

$T$  = absolute Temperatur [K]

$V_N$  = netto Retentionsvolumen [m<sup>3</sup>]

$L_{AV}$  = Avogadrozahl [1/mol]

$A_m$  = cross-sectional area [m<sup>2</sup>]

$\gamma_S^D$  = Dispersiver Anteil der Oberflächenenergie (Feststoff) [J/m<sup>2</sup>]

$\gamma_L^D$  = Dispersiver Anteil der Oberflächenenergie (Testgas) [J/m<sup>2</sup>]

$C$  = Konstante

In einem Diagramm  $R * T * \ln V_n$  gegen  $A_m * (\gamma_L^D)^{1/2}$  ergibt eine homologe Reihe von Alkanen eine Gerade. Aus der Geradensteigung kann der dispersive Anteil der Oberflächenenergie der Probe abgelesen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien und Geräte

Tabelle 5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage AE 200	Mettler Toledo Inc.; USA-OH-Columbus
Analysenwaage XP 205	Mettler Toledo Inc.; USA-OH-Columbus
BET SA 3100	Beckman Coulter Inc.; USA-CA-Brea
DSC 820 / TA 8000	Mettler Toledo Inc.; USA-OH-Columbus
DSM 940 A REM	Carl Zeiss AG; D-Oberkochen
EC 125/4 Nucleosil 100-5 C18 Säule	Macherey-Nagel GmbH; D-Düren
Kälteaggregat Julabo HP/FP50	Julabo GmbH; D-Seelbach
Nova 2000e BET	Quantachrome Instruments; USA-FL-Boynton Beach
Rheometer Physika MCR501	Anton Paar GmbH; A-Graz
SCF-Extraktionsanlage	Sitec-Sieber Engineering AG; CH-Maur/Zürich
Shimadzu prominence HPLC:	Shimadzu GmbH; J-Kyoto
- Degasser DGU-20A5	
- Liquid chromatograph LC-20AT	
- Autosampler SIL-20A	
- Column oven CTO-10ASVP	
- UV/Vis detector SPD-20A	
- Com. bus module CBM-20A	
SMS iGC	Surface Measurement Systems Ltd.; GB-Alperton
Spectrum One FTIR-Spektrometer	Perkin Elmer Inc.; USA-MA-Waltham



Sputtercoater E5100	Bio-rad Laboratories Inc.; USA-CA-Hercules
Ultra Turrax T25	IKA GmbH; D-Staufen
Vakuumtrockenschrank VDL 53	Binder GmbH; D-Tuttlingen
Waage Extend ED2201-CW	Sartorius AG; D-Göttingen

Tabelle 6: Verwendete Materialien

<b>Substanz</b>	<b>Charge</b>	<b>Hersteller / Lieferant</b>
Betulin HPLC-Referenz	B9757	Sigma Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim
Betulinsäure HPLC-Referenz	B8936	Sigma Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim
Birkenkork	001 11 004-11	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn
Birkenkork	20130001	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn
Erythrodiol HPLC-Referenz		Sigma Aldrich Chemie GmbH; D-Steinheim
Jojobaöl DAC	L501045	Gustav Heess GmbH; D-Leonberg
Jojobaöl DAC	133385	Gustav Heess GmbH; D-Leonberg
Kohlendioxid		Westfalen AG; D-Weißenhorn
Lupeol HPLC-Referenz	0912180	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn
Oleanolsäure HPLC-Referenz	253201863	Carl Roth GmbH; D-Karlsruhe
Triterpenextrakt (TE1)	010 09 091-1	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn
Triterpenextrakt (TE2)	01314007-7	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn
Triterpenextrakt (TE3)	0110800-3	Birken AG; D-Niefern-Öschelbronn

## 2 Material und Methoden

Tabelle 7: Verwendete Software

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
IGC Advanced Analysis Macro V1.41	Surface Measurement Systems Ltd.; GB-Alperton
LC Solution V1.21 SP1	Shimadzu GmbH; J-Kyoto
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp.; USA-WA-Redmond
Microsoft Excel 2013	Microsoft Corp.; USA-WA-Redmond
Microsoft Paint	Microsoft Corp.; USA-WA-Redmond
Microsoft Power Point 2013	Microsoft Corp.; USA-WA-Redmond
Microsoft Word 2013	Microsoft Corp.; USA-WA-Redmond
Rheoplus/32 V3.40	Anton Paar GmbH; A-Graz
Spectrum V3.01	Perkin Elmer Inc.; USA-MA-Waltham
STAR <sup>e</sup> SW 8.10	Mettler Toledo Inc.; USA-OH-Columbus
VisiDAQ Runtime V3.11	Advantech Ltd.; CHN-Taipeh

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid

Die Extraktion der Birkenrinde erfolgt an einer modifizierten CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage (Sitec Sieber AG, CH) im Labormaßstab. Das zu extrahierende Gut wird in eine Metallhülse eingebracht. Diese Hülse wird oben und unten mit Metallfritten verschlossen und umfasst ein Volumen von 3,3 l. Die Extraktion wird diskontinuierlich im Batch Verfahren durchgeführt. Das im Kreislauf befindliche CO<sub>2</sub> wird recycelt. Über die VisiDAQ Runtime V3.11 Software (Advantech, CHN) und die jeweilige Instrumentierung werden Druck, Temperatur, CO<sub>2</sub>-Massenfluss und CO<sub>2</sub>-Dichte erfasst und aufgezeichnet.

#### 2.2.1.1 Aufbau und Funktion der CO<sub>2</sub> Extraktionsanlage

In Abbildung 7 sind die für die Extraktion relevanten Bauteile der Extraktionsanlage dargestellt. Gasförmiges CO<sub>2</sub> (Westfalen AG, D) wird der Anlage über das Ventil V<sub>1</sub> zugeführt. Die automatische Steuerung übernimmt das Ventil PV<sub>1</sub>. Im Vorratstank K<sub>1</sub> wird das CO<sub>2</sub> unter Kühlung (3 °C; internes Kälteaggregat) bei einem Druck von 40 bar verflüssigt. Die Rohrleitung (6.) zur Hochdruckpumpe (2.) wird dabei ebenfalls gekühlt. Um der Wärmeentwicklung am Pumpenkopf entgegen zu wirken, wird dieser separat mit einem Kälteaggregat (Julabo HP/FP50) mit -20 °C (Ethanol) gekühlt. Daraus resultiert eine Betriebstemperatur am Pumpenkopf zwischen -3 °C und -7 °C. Bei geöffnetem Sicherheitsventil V<sub>2</sub> wird das flüssige CO<sub>2</sub> in einen kleinen Kreislauf gepumpt und K<sub>1</sub> direkt zugeführt. Schließt man V<sub>2</sub>, so wird das CO<sub>2</sub> unter Messung des Massenflusses und der Dichte (MF) über eine beheizte Rohrleitung (7.) in den Extraktionsbehälter B<sub>5</sub> gepumpt. Die Rohrleitung wird über ein Wasserbad und einen doppelten Mantel um die CO<sub>2</sub>-führende Kapillare auf die gewünschte Extraktionstemperatur gebracht. Liegt diese oberhalb von 31 °C, so findet der Übergang zum überkritischen Fluid statt. Der Extraktionsbehälter B<sub>5</sub> (3.) wird über den selben Thermostaten temperiert. Das zu extrahierende Gut befindet sich im Extraktor B<sub>5</sub> und wird somit von überkritischem CO<sub>2</sub> durchströmt. Dabei werden die Extraktivstoffe gelöst. Für die Extraktgewinnung, also die Abscheidung der Partikel aus der überkritischen Lösung, können mehrere Methoden angewendet werden. Bei der klassischen Extraktion wird die überkritische Lösung über ein pneumatisch

## 2 Material und Methoden

gesteuertes Ventil ( $C_{1\text{auto}}$ ) ab dem gewünschten Extraktionsdruck in einen Separator  $B_2$  (5.) entspannt. Im Separator herrschen Bedingungen für die Trennung in eine flüssige- und gasförmige  $\text{CO}_2$ -Phase entlang der Siedekurve. Dabei reichert sich der Extrakt in der flüssigen Phase an, während das gasförmige  $\text{CO}_2$  über einen Kondensator (9.) recycelt wird. Alternativ kann das RESS Verfahren angewendet werden. Dabei wird die überkritische Lösung durch  $V_{\text{RESS}}$  und eine feine Kapillare ( $\varnothing 150 \mu\text{m}$ ) direkt in die Gasphase verdüst. Das Verfahren kann mit Gegendruck der Anlage ( $V_{47}$  geöffnet;  $V_{27}$  geschlossen) und anschließendem Recyceln des  $\text{CO}_2$  in  $B_2$  betrieben werden, oder es wird auf Gegendruck und somit auf die Wiedergewinnung des  $\text{CO}_2$  verzichtet (Ablassen über  $V_{46}$ ). Detaillierte Beschreibungen der Abscheideverfahren sind unter 2.2.1.2 zu finden.

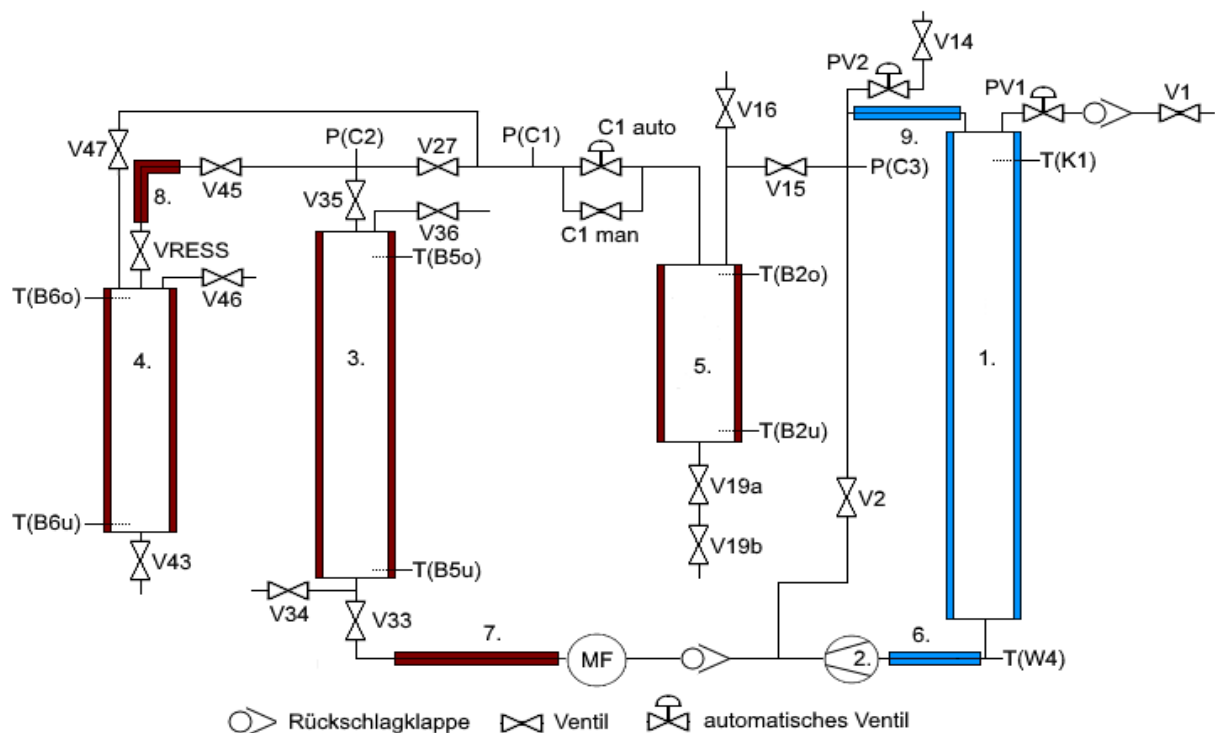


Abbildung 7: Schaltplan der  $\text{CO}_2$  Extraktionsanlage:

MF: Messung des  $\text{CO}_2$  Massenflusses

P: Druckmesser

T: Thermosensor

$V_{\text{RESS}}/C_{1\text{man}}$ : Mikrometerventil

$C_{1\text{auto}}$ : pneumatisch gesteuertes Ventil

1. Kondensator  $K_1$  ( $\text{CO}_2$  Vorratstank)

2.  $\text{CO}_2$ -Pumpe

3. Extraktor  $B_5$

4. RESS-Behälter  $B_6$

5. Separator  $B_2$

6. Unterkühler

7. Heizstrang (gekoppelt mit Heizung für  $B_5$ )

8. Separate Rohrheizung für RESS-Prozess

9. Kondensatorschleife

### **2.2.1.2 Verschiedene Abscheidemethoden für Extraktartikel aus überkritischer Lösung**

Zur Abscheidung der Extraktartikel stehen an der verwendeten Extraktionsanlage zwei verschiedene Methoden zur Verfügung. Da die Partikelabscheidung starken Einfluss auf die Extrakteigenschaften haben kann, wird im Folgenden auf beide Methoden eingegangen.

#### **2.2.1.2.1 Partikelabscheidung im Separator B<sub>2</sub>**

Beim klassischen Extraktionsprozess wird die überkritische Lösung ab dem gewünschten Extraktionsdruck über ein pneumatisch gesteuertes Ventil ( $C_{1auto}$ ) in den Separator B<sub>2</sub> entspannt (Abbildung 7). Der Separator wird über einen Doppelmantel mit Wasser beheizt (50 °C), um der Abkühlung, bedingt durch den Joule-Thomson-Effekt (1.4.5), entgegenzuwirken. Bei einem Druck von  $40 \pm 4$  bar im Separator resultiert daraus eine Phasentrennung des Kohlendioxids mit einem Temperaturgradienten innerhalb des Separators. In der Gasphase herrschen dabei Temperaturen von  $\sim 25$  °C, während die Flüssigphase am Boden von B<sub>2</sub> auf  $\sim 10$  °C abgekühlt wird. Da gasförmiges CO<sub>2</sub> kein Lösevermögen für die in der Birkenrinde enthaltenen Extraktivstoffe aufweist, reichert sich der Extrakt in der flüssigen CO<sub>2</sub>-Phase an. Das Niveau der Flüssigphase wird über ein Sichtfenster auf halber Höhe von B<sub>2</sub> kontrolliert und über den CO<sub>2</sub>-Massenfluss in der unteren Hälfte von B<sub>2</sub> gehalten. Dadurch ergibt sich eine Limitierung des Massenflusses mit Maximalwerten von  $\sim 15$  kg/h bei 350 bar Extraktionsdruck und einer CO<sub>2</sub>-Dichte von  $\sim 850$  kg/m<sup>3</sup>. Nach der gewünschten Extraktionszeit wird der CO<sub>2</sub>-Kreislauf unterbrochen und anschließend der Separator B<sub>2</sub> entspannt ( $V_{16}$ ). Dabei geht die flüssige CO<sub>2</sub>-Phase vollständig in die Gasphase über und die gelösten Extraktartikel fallen aus. Das Entspannen des Separators kann über schlagartiges Öffnen des Auslassventils  $V_{16}$  erfolgen (25 – 175 s) oder über einen längeren Zeitraum (280 – 300 s) durch vorsichtiges Öffnen von  $V_{16}$ . Dabei ist die Höhe des CO<sub>2</sub>-Flüssigniveaus entscheidend für die Dauer des Entspannungsvorgangs.

## 2 Material und Methoden

### 2.2.1.2.2 Extraktionsparameter für die Partikelabscheidung im Separator B<sub>2</sub>

Zur Optimierung der Ausbeute und zur Herstellung von Extrakten mit verschiedenen Eigenschaften und Zusammensetzungen werden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Extraktionsparametern durchgeführt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht über verschiedene Extraktionsparameter bei der Partikelabscheidung im Separator

<b>Parameter</b>	<b>Versuchsbereich / Versuchsbedingungen</b>	<b>Resultierende CO<sub>2</sub>- Dichte [kg/m<sup>3</sup>]</b>
Druck	100 bar	~325
	200 bar	~700
	350 bar	~850
Temperatur	40 °C	~925
	60°C	~850
Massenfluss	~5 kg/h	~850
	10-15 kg/h	~850
Abscheidegeschwindigkeit	Schnell: 25-175 s	
	Langsam: 280-300 s	
Fixierung des Ausgangsmaterials	Glaskugeln und Gewicht	
	Ohne Fixierung	
Masse Ausgangsmaterial (Upscale)	50 g	
	100 g	
	200 g	
Inkubation	72 h unterkritisch	
	24 h überkritisch	
Fraktionierung	3+3+3 h Extraktion	

Die Einflussgrößen Extraktionsdruck, Extraktionstemperatur und CO<sub>2</sub>-Massenfluss werden auf verschiedenen Niveaus getestet. Dabei verändert sich die CO<sub>2</sub>-Dichte, was einen großen Einfluss auf das Extraktionsverhalten haben sollte. Durch Variieren der

Abscheidegeschwindigkeit soll untersucht werden, ob dadurch Einfluss auf die Eigenschaften der Extrakte genommen werden kann. Außerdem werden Versuche durchgeführt, bei denen der Einfluss von unterschiedlichen Mengen Ausgangsmaterial auf die Extraktion und somit das Scale-up Verhalten untersucht wird. Die Fixierung des Birkenkorks (50 g) im Extraktor mit Glaskugeln (668 g;  $d = 5 \text{ mm}$ ) (Abbildung 8) könnte eine Dochtbildung des Kohlendioxids im Ausgangsmaterial verhindern und wird deshalb gegen loses Einfüllen des Birkenkorks getestet.

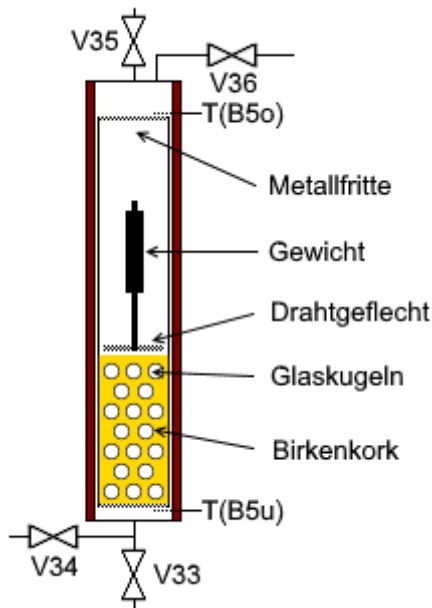


Abbildung 8: Fixierung von Birkenkork in B5 mit Glaskugeln und Gewicht

Ein weiterer Versuch sieht die Inkubation des Ausgangsmaterials mit  $\text{CO}_2$  bei über- und unterkritischen Bedingungen vor, um zu untersuchen, ob sich durch eine längere Equilibrierungszeit die Ausbeuten verbessern lassen. Bei mehrfacher Extraktion desselben Materials soll untersucht werden, ob sich mit dieser fraktionierten Extraktion durch unterschiedliche Löslichkeiten der Inhaltsstoffe Extrakte mit verschiedenen Triterpenzusammensetzungen herstellen lassen.

### 2.2.1.2.3 Partikelabscheidung im RESS-Verfahren

Beim RESS-Verfahren (Rapid expansion of supercritical solutions) wird eine überkritische Lösung direkt in die Gasphase verdüst. Dabei wird die Lösung ab dem gewünschten Extraktionsdruck über ein manuell gesteuertes Micrometerventil ( $V_{\text{RESS}}$ ) in den RESS Behälter  $B_6$  (4.) eingeleitet. Die Lösung passiert eine Kapillare ( $\varnothing 150 \mu\text{m}$ ) und expandiert schlagartig, wodurch die Zeit zum Ausfallen des Extraktes

## 2 Material und Methoden

minimiert wird und besonders feine Partikel entstehen. Durch die manuelle Steuerung des CO<sub>2</sub>-Durchsatzes schwankt der Extraktionsdruck bei diesen Versuchen stärker als bei der klassischen Extraktion. Das Zusetzen der Düse mit Extrakt und Trockeneis im Laufe der Extraktion fördert diesen Effekt zusätzlich. Für sämtliche RESS-Versuche wird der Extraktionsdruck zwischen 320 bar und 360 bar gehalten, um eine optimale Lösungskonzentration zu erhalten. Die Extraktionstemperatur beträgt bei RESS-Extraktion 60 °C. Der Abscheidebehälter B<sub>6</sub> und die Rohrleitung zwischen B<sub>5</sub> und B<sub>6</sub> werden über einen Doppelmantel mit Wasser (65 °C) geheizt.

Durch verschieden lange Rohrleitungen zwischen dem Deckel von B<sub>6</sub> und der Düse kann die Position der Düse innerhalb des Abscheideraums variiert werden (Abbildung 9 b/c). Im Folgenden werden Versuche, bei denen sich die Düse im oberen Drittel des Abscheideraums befinden, als top spray Methode bezeichnet. Ist die Düse im unteren Drittel lokalisiert, wird der Begriff bottom spray verwendet. Das Auffangen der Extraktpartikel kann mit Hilfe eines Glaszylinders (d = 5,5 cm; h = 27,3 cm) erfolgen (Abbildung 9 b), oder es wird direkt in die Metallfritte (d = 9,8 cm; h = 44,2 cm) gesprüht (Abbildung 9 c). Dabei ist die Problematik der Temperaturerfassung zu beachten (2.2.1.2.4). Für top- und bottom spray Methode wird je eine Versuchsreihe mit fraktionierter Extraktion durchgeführt. Bei beiden Methoden wird dasselbe Ausgangsmaterial (je 200 g) zehnmal für je drei Stunden extrahiert.

Es soll außerdem ein modifiziertes RESS-Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, in einem Prozessschritt aus den Ausgangsstoffen ein triterpenstabilisiertes Gel herzustellen. Dafür wird die Düse in einen Plastikzylinder mit perforiertem Deckel eingebaut (7.4). Durch das reduzierte Expansionsvolumen wird eine effektivere Wärmeübertragung notwendig, um Trockeneisbildung zu minimieren. Dies wird durch ein Wasserbad im Inneren von B<sub>6</sub> erreicht. Im Plastikzylinder befindet sich die Ölphase, welche mit Hilfe der Extraktpartikel verfestigt werden soll (Abbildung 9 d). Um zu verhindern, dass Wasser in den Kreislauf der Extraktionsanlage kommt, wird dieses Setup ausschließlich ohne Gegendruck durchgeführt. Damit die Düse möglichst nahe an einem Thermofühler lokalisiert ist, wird diese Methode im top spray Verfahren durchgeführt.



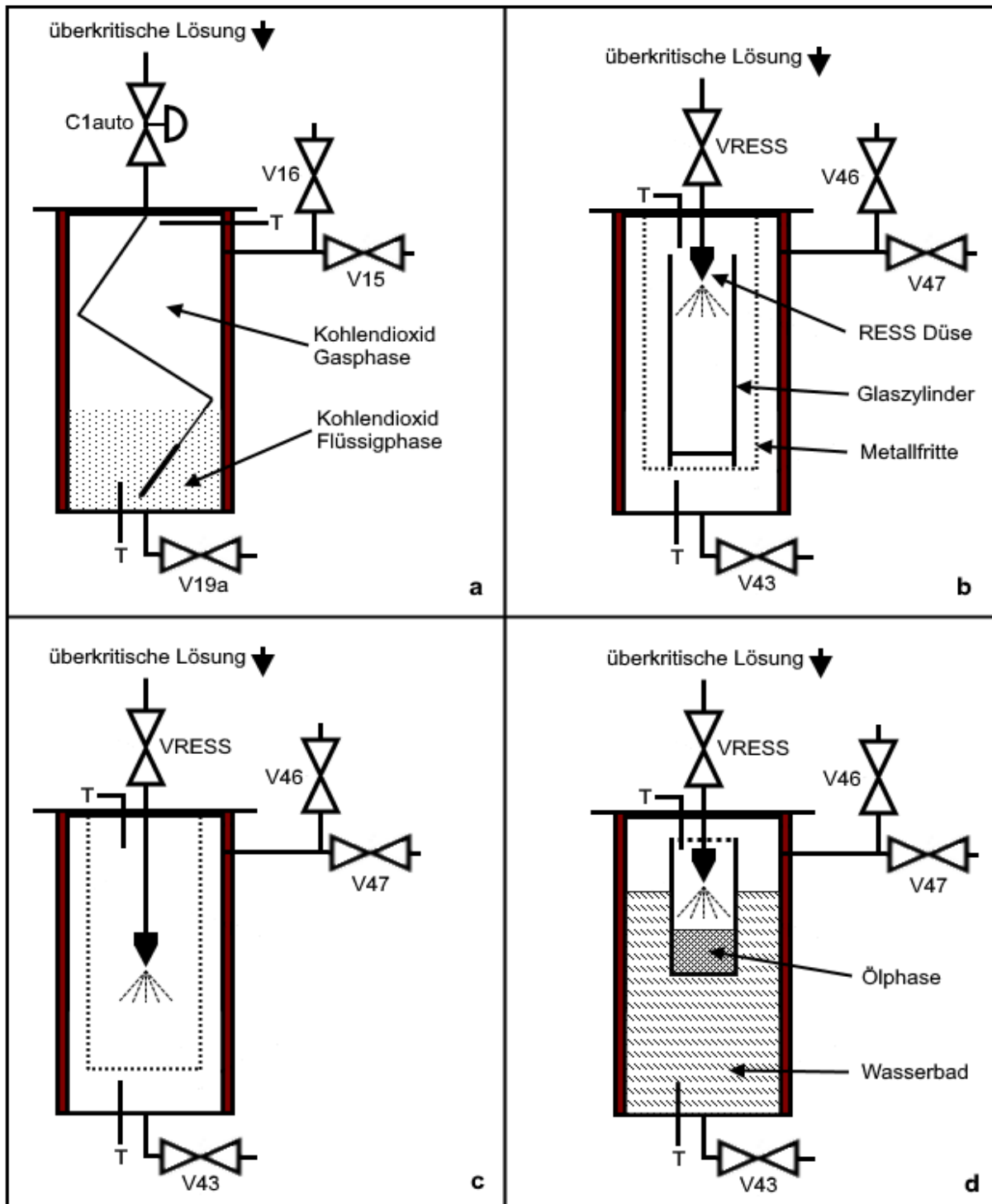


Abbildung 9: Verschiedene Abscheidemethoden für Extraktpartikel aus überkritischer Lösung

(T=Thermosensor):

a: Abscheidung in einem Separator

b: RESS-Verfahren im top spray Setup

c: RESS-Verfahren im bottom spray Setup

d: direkte Gelherstellung im RESS-Verfahren

### 2.2.1.2.4 Temperierung und Temperaturerfassung beim RESS-Verfahren

Der Temperaturkontrolle und -steuerung kommt beim RESS-Verfahren eine besondere Bedeutung zu. Durch die schlagartige Expansion des überkritischen Kohlendioxids kommt es zu einer massiven Abkühlung im Bereich der Düse. Über die Temperierung des RESS-Behälters  $B_6$  wird diesem Temperaturabfall entgegengewirkt. Bei einer mangelhaften Temperierung kann es, bedingt durch den Temperaturabfall, zu Trockeneisbildung und der Bildung einer  $\text{CO}_2$ -Flüssigphase kommen. Trockeneis kann dabei die Düse verstopfen und zu einem unkontrollierten Anstieg des Extraktionsdrucks im Behälter  $B_5$  führen.

Bei der Bildung einer  $\text{CO}_2$ -Flüssigphase in  $B_6$  gehen die Vorteile des RESS-Verfahrens verloren und die Partikelabscheidung erfolgt analog zur klassischen Extraktion. Die Temperaturerfassung sollte deshalb möglichst nah an der Düse erfolgen, um mögliche Temperaturänderungen ohne Verzögerung zu erfassen. Bei einem starken Abfall der Temperatur wird der  $\text{CO}_2$ -Durchsatz über  $V_{\text{RESS}}$  oder den  $\text{CO}_2$ -Massenfluss (Pumpenhub) der Anlage reduziert. Ein Temperaturanstieg deutet auf eine verstopfte Düse hin und kann mit vorsichtigem Öffnen und Schließen von  $V_{\text{RESS}}$  gelöst werden. Insgesamt ergibt sich durch die starke Abkühlung eine Limitierung des  $\text{CO}_2$ -Massenflusses, sodass beim RESS-Verfahren kaum Werte über 2 kg/h realisiert werden können, während bei der klassischen Extraktion Massenflüsse bis 15 kg/h kein Problem darstellen. Im RESS-Behälter sind zwei Durchbrüche für den Einsatz von Thermofühlern vorhanden, sodass die Temperaturerfassung im oberen und unteren Bereich des Behälters erfolgen kann. Unter 3.1.3 wird auf die Durchführbarkeit verschiedener Setups in Hinblick auf die Temperaturerfassung eingegangen.

### 2.2.2 HPLC-Analytik von Triterpenen

Um die Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten zu bestimmen, wird eine HPLC-Methode zur Trennung und Quantifizierung der im Birkenkork vorkommenden Triterpene entwickelt. Die im Birkenkork hauptsächlich enthaltenen Triterpene sind Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol [2]. Zur Trennung wird als stationäre Phase eine RP-C18 Säule (EC 125/4 Nucleosil 100-5; Macherey-Nagel, D) verwendet. Als mobile Phase dient ein Gemisch aus Acetonitril und Wasser unter Zusatz von 0,1 % (V/V) Phosphorsäure. Um eine ausreichende Trennung der Stoffe und eine akzeptable Analysendauer zu erreichen, wird ein Fließmittelprogramm angewendet (Tabelle 9). Die Analyse wird auf einer Shimadzu prominence HPLC-Anlage durchgeführt. Detektiert werden die Analyten mit einem UV-Vis-Detektor (Shimadzu, J) bei 210 nm. Zur Probenvorbereitung werden die Extrakte und Referenzsubstanzen in Isopropanol gelöst (5 min Ultraschall), falls nötig verdünnt und anschließend 10 µl Probe auf die Säule aufgebracht. Die Auswertung erfolgt über die Software LC Solution V1.21 (Shimadzu, J) mit automatischer Peakintegration (manuelle Korrektur bei fehlerhafter Integration).

Tabelle 9: Fließmittelprogramm zur Trennung von Triterpenen aus Birkenkorkextrakt

Zeit [min]	Modus	Verhältnis Acetonitril / Wasser	Flussrate [ml/min]
0 – 13	isokratisch	75/25	1,2
14 – 18	Gradient	auf 90/10	1,2
19 – 35	isokratisch	90/10	1,2
36 – 40	Gradient	auf 75/25	1,2
41 – 45	isokratisch	75/25	1,2

Die Validierung erfolgt basierend auf der ICH Guideline Q2(R1). Der Kalibrierbereich wird für die einzelnen Triterpene so festgelegt, dass er die zu erwartenden Konzentrationen in den Extrakten abdeckt. Als Anhaltspunkt dient hier der jeweilige Gehalt in einem Lösemittelextrakt bekannter Zusammensetzung. In Tabelle 10 und Tabelle 11 sind die wichtigsten Daten zur Validierung zusammengefasst. Ausführliche Daten zur Validierung finden sich im Anhang unter (7.1).

## 2 Material und Methoden

Tabelle 10: Zusammenfassung der Validierungsparameter zur HPLC-Analytik von Triterpenen

<b>Substanz</b>	<b>Kalibrierbereich [mg/ml]</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Bestimmungs- grenze [mg/ml]</b>	<b>Relative Verfahrens-SD [%]</b>
BE	0,5 - 1,5	0,9950	0,249	2,49
BS	0,01 – 0,08	0,9997	0,004	0,97
OS	0,005 – 0,03	0,9995	0,002	1,13
ER	0,005 – 0,03	0,9997	0,002	0,89
LU	0,05 – 0,525	0,9993	0,047	1,71

Tabelle 11: Fortsetzung Zusammenfassung der Validierungsparameter zur HPLC-Analytik von Triterpenen

<b>Substanz</b>	<b>Retentionszeit [min]</b>	<b>Wiederfindung [%]</b>	<b>Anzahl Proben</b>
BE	9,26 ± 0,04	100,22 ± 2,28	36
BS	6,59 ± 0,04	100,35 ± 2,12	48
OS	6,85 ± 0,03	100,33 ± 1,91	36
ER	12,66 ± 0,05	100,33 ± 1,70	36
LU	36,60 ± 0,17	100,55 ± 5,75	36

### **2.2.3 Rheologische Charakterisierung halbfester Zubereitungen**

Triterpentrockenextrakte sind in der Lage halbfeste Systeme zu stabilisieren [4]. Extrakte aus überkritischer Fluid Technologie sollen hinsichtlich ihrer Fähigkeit Oleogele und Cremes zu stabilisieren mit einem Lösemittel-extrakt verglichen werden. Als lipophile Grundlage für die Zubereitungen wird Jojobaöl verwendet. Jojobaöl dient für die auf dem Markt befindliche und ebenfalls auf Birkenkorkextrakt basierende Imlan Serie als Grundlage und wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits erfolgreich als Basis für die Herstellung halbfester Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt verwendet [2; 3]. Die Ergebnisse belegen, dass sich Jojobaöl aufgrund seiner mittleren Polarität (verglichen mit Paraffin, Aprikosenkernöl und Rizinusöl) gut für die Stabilisierung von Gelen dieser Art eignet [2].

#### **2.2.3.1 Herstellung halbfester Zubereitungen**

Die experimentelle Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub> liefert insbesondere bei der Anwendung des RESS-Verfahrens nur geringe Ausbeuten. Es müssen folglich Methoden zur Herstellung geringer Mengen halbfester Zubereitungen entwickelt werden.

##### **2.2.3.1.1 Herstellung von Oleogelen in kleinem Maßstab**

Der Triterpentrockenextrakt wird in ein Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit der benötigten Menge lipophiler Grundlage (Jojobaöl) überschichtet und für 2 min bei 8000 U/min mit einem Ultra Turrax (Ø 1 cm) (IKA, D) homogenisiert. Für Ansätze von bis zu 5 g Zubereitung werden Röhrchen mit einem Volumen von 15,0 ml (Ø in. 1,4 cm) verwendet, bei Ansätzen bis 15 g Zubereitung, Röhrchen mit einem Volumen von 30,0 ml (Ø in. 2,0 cm).

Alternativ werden Gele von Hand hergestellt. Die Homogenisierung erfolgt hier durch Rühren mit einem Spatel für 30 s, anstelle der Verwendung des Ultra Turrax. Dabei soll der Einfluss des Energieeintrags auf die Gelbildung verschiedener Extrakte untersucht werden.

Die direkte Gel Herstellung im modifizierten RESS-Verfahren (m-RESS) wird unter 2.2.1.2.3. beschrieben.

## 2 Material und Methoden

### 2.2.3.1.2 Herstellung von Cremes

Es werden drei verschiedene Verfahren zur Herstellung von Cremes getestet:

- Direktherstellung: Die lipophile Grundlage, der Birkenkorkextrakt und das Wasser werden in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt und für 2 min bei 8000 U/min im Ultra Turrax homogenisiert.
- Vorgelierung: Bei dieser Methode wird Wasser in ein fertiges Oleogel (2.2.3.1.1) eingearbeitet. Das Wasser wird in drei gleichen Teilen zugegeben und mit dem Ultra Turrax jeweils 1 min bei 9500 U/min homogenisiert.
- Spritze-Spritze: Hier wird ein fertiges Oleogel (hergestellt im Ultra Turrax (2.2.3.1.1)) in eine Luer-Lock Spritze überführt. Die Wasserphase befindet sich in einer zweiten Luer-Lock Spritze. Beide Spritzen werden über einen weiblich/weiblich Adapter unter Vermeidung von Lufteinschlüssen verbunden. Anschließend erfolgt die Homogenisierung durch 200-maliges, schnelles Überführen der Zubereitung von Spritze zu Spritze. Dabei sorgt die Querschnittsverkleinerung durch den Adapter für eine schnellere Strömungsgeschwindigkeit, was zu einer Homogenisierung durch turbulente Strömung führt.

### 2.2.3.2 Rheologische Messungen

Um Unterschiede zwischen verschiedenen Extrakten bei der Stabilisierung von Gelen und Cremes zu untersuchen, müssen die halbfesten Zubereitungen charakterisiert werden. Die hergestellten Gele und Cremes werden an einem Physika MCR501 Rheometer (Anton Paar GmbH, A) mit einem Platte-Platte Setup vermessen. Da nur wenig Probensubstanz zur Verfügung steht, wird ein schmaler Spalt von 0,8 mm und eine kleine Platte mit einem Durchmesser von 25 mm gewählt. Die Messungen erfolgen bei einer Temperatur von 23 °C. Falls nicht anders angegeben, findet die Messung 24 ± 4 h nach der Gel-/ Cremeherstellung statt. Ausgewertet werden die Messungen mit Hilfe der Rheoplus/32 V3.40 Software (Anton Paar GmbH, A).

Es werden Amplitudensweeps (AS) und 3-Intervall-Thixotropie-Tests (3ITT) durchgeführt (Tabelle 12 und Tabelle 13). Als Auswertungsparameter für die Gel-/ Cremestärke und Viskosität wird der mittlere Speichermodulwert  $G'$  im linear viskoelastischen Bereich (LVE) herangezogen. Der Verlustfaktor  $\tan \delta$  im LVE dient

als Maß für den Gelcharakter. Ein weiterer Wert zur Charakterisierung halbfester Zubereitungen ist der Crossover Punkt von Speicher- und Verlustmodul. Bei den Intervall-Thixotropie-Tests wird zusätzlich die Wiederherstellung des Speichermodulwertes und des Verlustfaktors im dritten Abschnitt zur Beurteilung des thixotropen Verhaltens herangezogen (1.5.4).

*Tabelle 12: Parameter für Amplitudensweep*

<b>Amplitudensweep</b>	<b>Vorscherung</b>	<b>Ruhephase</b>	<b>log Rampe</b>
Anzahl Messpunkte	2	1	100
Messpunktdauer [s]	20	300	2
Rotation (Scherrate $\dot{\gamma}$ [1/s])	5		
Oszillation (Deformation $\gamma$ [%])			0,01-1000
Frequenz [Hz]			1

*Tabelle 13: Parameter für 3-Intervall-Thixotropie-Test*

<b>3-Intervall- Thixotropie-Test</b>	<b>Vorscherung</b>	<b>Intervall 1: moderate Scherung</b>	<b>Intervall 2: log Rampe</b>	<b>Intervall 3: moderate Scherung</b>
Anzahl Messpunkte	2	10	19	9
Messpunktdauer [s]	20	100	6 Pkt. / Dekade	100
Rotation (Scherrate $\dot{\gamma}$ [1/s])	5			
Oszillation (Deformation $\gamma$ [%])		0,01	0,1-100	0,01
Frequenz [Hz]		1	1	1

### **2.2.4 Rasterelektronenmikroskopie (REM)**

Zur Beurteilung der Oberflächenbeschaffenheit der Extraktpartikel werden Aufnahmen mit einem DSM 940 A Rasterelektronenmikroskop (Zeiss, D) gemacht. Zuvor werden die Proben in einem E 5100 Sputtercoater (Bio-rad, USA-CA) bei ~ 0,04 mbar für 4 mal 60 s, bei 20 mA und einer Beschleunigungsspannung von 2,1 kV mit Gold bedampft.

### **2.2.5 FTIR Spektroskopie**

Die Infrarotspektren der Extrakte und halbfesten Zubereitungen werden an einem FTIR-Spektrometer Spectrum One (Perkin Elmer, USA-MA) in der Abteilung der Pharmazeutischen Chemie der Eberhard Karls Universität Tübingen aufgenommen. Dabei wird die ATR-Infrarotspektroskopie (abgeschwächte Totalreflexion) als Messtechnik verwendet. Die Proben werden dazu in das evaneszente Feld auf einem Lichtwellenleiter aufgebracht und die wellenlängenabhängige Absorption gemessen. Der vermessene Wellenlängenbereich liegt zwischen  $4000\text{ cm}^{-1}$  und  $500\text{ cm}^{-1}$ . Zur Auswertung wird die Software Spectrum 3.01 (Perkin Elmer, USA-MA) verwendet.

### **2.2.6 Messung der spezifischen Oberfläche nach Brunauer, Emmett und Teller (BET)**

Die spezifische Oberfläche der Triterpentrockenextrakte wird nach der Methode von Brunauer, Emmett und Teller (BET) mittels Gasadsorption (Stickstoff) bestimmt [100]. Die Messungen werden an einer SA 3100 (Beckman Coulter, USA-CA) oder einer Nova 2000e (Quantachrome Instruments, USA-FL) Anlage durchgeführt. Vor der Messung werden die Proben bei  $40\text{ °C}$  unter Vakuum für 240 min entgast. Das Entgasen wird entweder in der jeweiligen, geräteeigenen Entgasungsstation, oder alternativ in einem Vakuumtrockenschrank (Binder GmbH, D) durchgeführt. Für die Messung werden die Probengefäße in flüssigen Stickstoff getaucht, um eine Messtemperatur von  $-196\text{ °C}$  zu erreichen. Die Proportionalität der adsorbierten bzw. freiwerdenden Gasmenge zur Oberfläche wird anhand einer fünf Punkt Messung entlang der Adsorptions-Desorptions-Isothermen hergestellt.



### **2.2.7 Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergie durch inverse Gaschromatographie (iGC)**

Die Messungen zur Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergie der Extrakte werden extern in der Abteilung Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel an einer iGC Anlage (SMS, GB) durchgeführt. Spezielle iGC Säulen mit einem Durchmesser von 3 mm werden mit Probenmaterial gepackt (~ 0,120 g für SCF-E; ~ 0,090 g für OS-E). Über diese Säulen werden verschiedene Alkane (Hexan, Heptan, Octan, Nonan und Decan) in infiniten Verdünnung (0,03 p/p<sup>0</sup>) geleitet. Die Detektion der Peaks und die Bestimmung der Retentionszeiten erfolgt mit Hilfe eines Flammenionisationsdetektors (FID). Mit Methan wird das Totvolumen bestimmt. Für die Berechnung der dispersiven Oberflächenenergie wird das iGC Advanced Analysis Macro V1.41 (SMS, GB) für Microsoft Excel 2010 (Microsoft, USA-WA) verwendet (Mönckedieck 2015, persönliche Mitteilung).

### **2.2.8 DSC Analyse (Differential Scanning Calorimetry)**

Um ihr thermisches Verhalten zu untersuchen, werden Triterpentrockenextrakte mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie analysiert. Die Messungen werden an einer DSC 820/TA 8000 Anlage (Mettler Toledo, USA-OH) durchgeführt. Als Probengefäße werden 40 µl Aluminiumtiegel mit einem perforierten Deckel verwendet. Die Extrakte werden in die Tiegel eingewogen (4,0 mg – 12,0 mg) und diese anschließend vercrimpt. Als Referenz dient ein leerer Aluminiumtiegel. Der Temperaturmessbereich liegt zwischen 40 °C und 270 °C, bei einer Heizrate von 10 K/min. Im Temperaturbereich des zu erwartenden Schmelzpunktes (225 °C – 260 °C) werden zusätzlich Messungen mit einer Heizrate von 2 K/min durchgeführt. Die Auswertung erfolgt über die STAR<sup>e</sup> SW 8.10 Software (Mettler Toledo, USA-OH). Da es sich bei den Extrakten um Stoffgemische handelt und daher keine scharfen Schmelzpeaks zu erwarten sind, wird nicht die Onset Temperatur, sondern das Peakminimum des endothermen Schmelzpeaks zur Beurteilung herangezogen.

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

### **3.1 Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid**

#### **3.1.1 Entnahme und Nachbehandlung der Extrakte**

Der bei der Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem CO<sub>2</sub> anfallende Triterpentrockenextrakt weist eine weißliche bis leicht gelbliche Färbung und pulverförmige Konsistenz auf. Optisch unterscheiden sich die überkritischen Fluidextrakte nicht wesentlich von vergleichbaren Lösemittelextrakten. Bei der Abscheidung im Separator fallen zusätzlich zur Pulverfraktion bei manchen Chargen gelbliche Partikel von harzartiger Haptik an. Diese lassen sich gut vom restlichen Pulver separieren und werden nicht für die weitere Analytik verwendet. Entnommen wird der gewonnene Extrakt aus dem Separator bzw. dem RESS-Behälter direkt nach der Herstellung mit Hilfe eines Metalllöffels. Insbesondere bei einer schnellen Entspannung des Separators fällt der Extrakt zusammen mit CO<sub>2</sub> Trockeneis an. Deshalb wird der gesamte Extrakt auf einer Glasplatte (Ø 20 cm) ausgebreitet und bis zur Gewichtskonstanz im Abzug belassen. Nach Auswiegen der Ausbeute erfolgt die Lagerung bei Raumtemperatur in Kunststoffkruken.

#### **3.1.2 Optimierung der Ausbeute bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid**

Die Extraktionen erfolgen an der unter 2.2.1.1 beschriebenen Extraktionsanlage mit den unter 2.2.1.2 aufgeführten Methoden. Zur Optimierung der Ausbeute bei der Extraktion mit überkritischen Fluiden stehen mehrere variable Versuchsparameter zur Verfügung:

##### **3.1.2.1 Ausbeute in Abhängigkeit vom Extraktionsdruck und der CO<sub>2</sub>-Dichte**

Um die Abhängigkeit der Ausbeute vom Extraktionsdruck bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub> zu untersuchen, werden je 50,0 g Ausgangsmaterial bei 60 °C auf drei verschiedenen Druckstufen für 3 h extrahiert. Der

durchschnittliche CO<sub>2</sub>-Massenfluss wird für die Versuchsreihe konstant zwischen 13,24-14,87 kg/h gehalten.

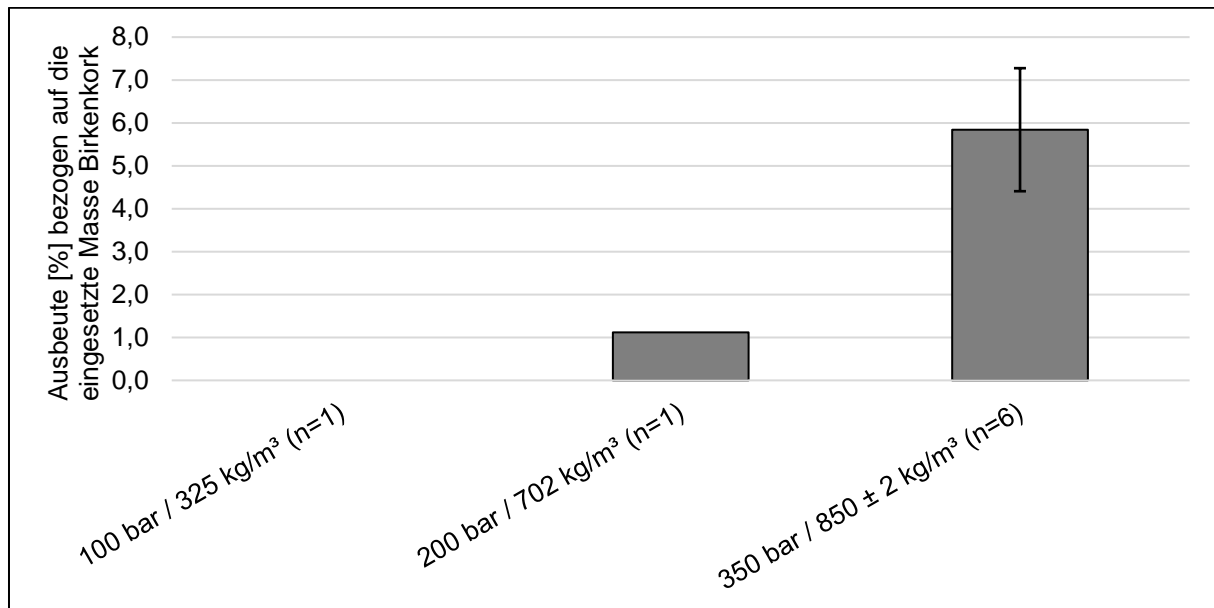


Abbildung 10: Extraktionsausbeute bei verschiedenen Extraktionsdrücken und den daraus resultierenden CO<sub>2</sub>-Dichten (MW ± SD)

Auf dem niedrigsten Drucklevel von 100 bar fällt nach drei Stunden Extraktionszeit keine entnehmbare Ausbeute in Separator B<sub>2</sub> an. Die resultierende CO<sub>2</sub> Dichte von 325 kg/m<sup>3</sup> ist somit nicht hoch genug und das CO<sub>2</sub> nicht in der Lage, Extraktivstoffe zu solvatisieren und aus der Pflanzenmatrix zu lösen. Verdoppelt man den Extraktionsdruck auf 200 bar, so steigt die Dichte des CO<sub>2</sub> auf über 700 kg/m<sup>3</sup> an. Die erhaltene Ausbeute von 560 mg Extrakt entspricht einem prozentualen Anteil von 1,1 % bezogen auf die Ausgangsmasse an Birkenkork. Eine weitere Drucksteigerung auf 350 bar geht einher mit einem Anstieg der CO<sub>2</sub> Dichte auf ~850 kg/m<sup>3</sup>. Bei diesen Bedingungen ist es möglich, eine durchschnittliche Ausbeute von 5,8 ± 1,4 % zu erreichen. Da in der Literatur ähnliche Beobachtungen mit einer Ausbeutensteigerung bei höheren Drücken beschrieben sind [9], wird auf weitere Versuche bei 100 bar und 200 bar verzichtet. In Abbildung 10 ist somit eine starke Abhängigkeit der Extraktionsausbeute vom Extraktionsdruck zu erkennen. Verantwortlich für diese Abhängigkeit ist die CO<sub>2</sub>-Dichte, die sich mit steigendem Druck erhöht und bei 350 bar flüssigkeitsähnliche Werte erreicht. Der Standardextraktionsdruck wird für die folgenden Versuche auf 350 bar festgelegt.

### 3.1.2.2 Ausbeute in Abhängigkeit von der Extraktionstemperatur

Der Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute wird auf zwei Temperaturniveaus von 40 °C und 60 °C getestet. Mit der wassergestützten Beheizung des Extraktors und der Rohrleitungen lässt sich ein stabiler Prozess zwischen 40 °C und 60 °C realisieren. Bei tieferen Temperaturen besteht die Gefahr, dass die überkritische Phase verlassen wird. Der Versuch, eine konstante Temperatur von über 60 °C über die gesamte Prozessstrecke zu erreichen, könnte zu ungewollten Temperaturgradienten führen. Deshalb werden die Versuche in den beiden, für die Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub> sinnvollen, Grenzbereichen durchgeführt. Bei beiden Versuchsreihen beträgt der Extraktionsdruck 350 bar. Aus diesen Parametern resultieren mittlere CO<sub>2</sub>-Dichten von  $925,7 \pm 0,6 \text{ kg/m}^3$  bei 40 °C und  $850,2 \pm 2,0 \text{ kg/m}^3$  bei 60 °C. Diese Diskrepanz der Dichte kann durch den erhöhten Platzbedarf durch die schnellere Molekülbewegung bei isobarer Temperaturerhöhung, einhergehend mit einer Entropiezunahme, erklärt werden. Bedingt durch die höhere Dichte bei 40 °C können für den CO<sub>2</sub>-Massenfluss, der unter anderem durch das Volumen und die Beheizung des Separators limitiert ist, bei dieser Temperatur nicht die Werte erreicht werden, wie dies bei 60 °C der Fall ist. Ein durchschnittlicher Massenfluss von  $9,9 \pm 0,4 \text{ kg/h}$  bei 40 °C steht dem von  $13,8 \pm 0,5 \text{ kg/h}$  bei 60 °C gegenüber. Abbildung 11 zeigt die durchschnittliche Ausbeute nach dreistündiger Extraktion bei den beiden unterschiedlichen Temperaturniveaus. Bei 40 °C beträgt die Ausbeute  $1,6 \pm 0,7 \%$ . Eine Temperaturerhöhung um 20 °C bedingt eine Steigerung der Ausbeute auf  $5,8 \pm 1,4 \%$ . Die Ausbeutensteigerung bei Temperaturerhöhung deckt sich mit Beobachtungen bei ähnlichen Extraktionsversuchen [9]. Daher wird auf weitere Untersuchungen bei 40 °C verzichtet. In 3.1.2.1 wird gezeigt, dass eine hohe CO<sub>2</sub>-Dichte einen positiven Effekt auf die Ausbeute hat. Demzufolge müsste die Ausbeute bei 40 °C aufgrund der höheren Dichte, verglichen mit der Versuchsreihe bei 60 °C, größer sein. Die Ausbeutensteigerung durch höhere Dichten sollte aber auch einer Limitierung unterliegen und oberhalb einer gewissen Dichte keinen wesentlichen Vorteil mehr bringen [112]. Dieser Punkt könnte jenseits von  $900 \text{ kg/m}^3$  bereits erreicht sein, was den Einfluss der Dichte auf die Ausbeute bei dieser Versuchsreihe minimieren würde.

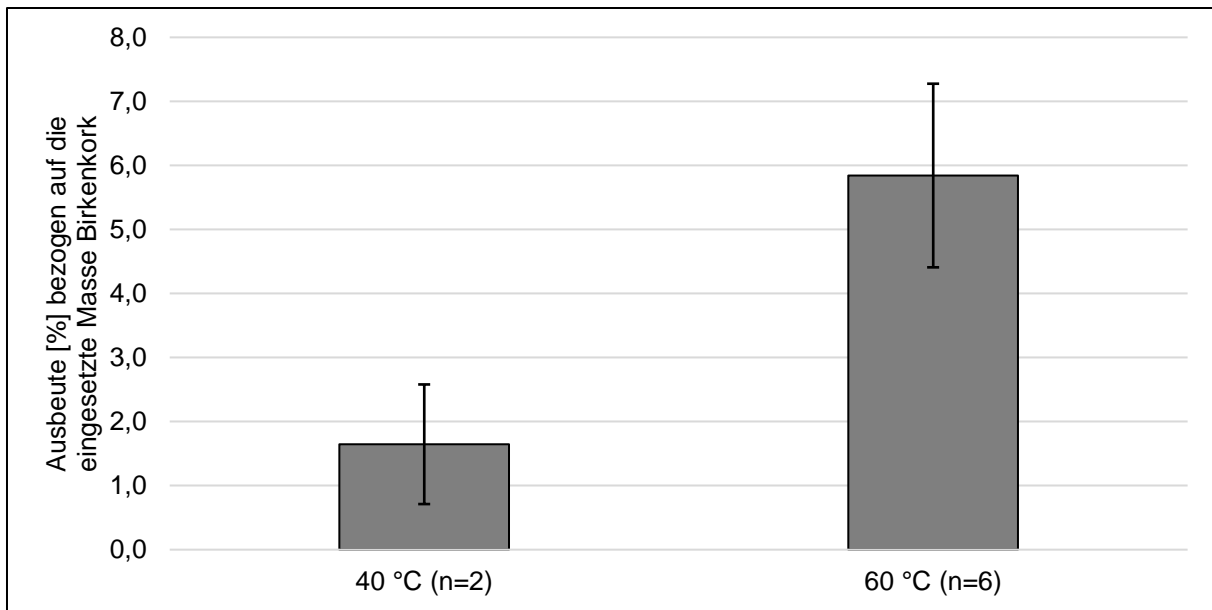


Abbildung 11: Einfluss der Extraktionstemperatur auf die Ausbeute bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub> (MW ± R; MW ± SD)

Eine Erklärung für die geringere Ausbeute bei 40 °C ist im CO<sub>2</sub>-Massenfluss zu suchen. Dieser ist bei 40 °C deutlich geringer, und somit auch der Gesamtdurchsatz an CO<sub>2</sub>. Der Einfluss des Massenflusses auf die Ausbeute wird daher noch eingehender untersucht (3.1.2.3). Ein weiterer Grund für die höheren Ausbeuten bei 60 °C ist die schnellere Molekularbewegung bei höheren Temperaturen. Dadurch kann sich das Extraktionsgleichgewicht im Extraktor schneller einstellen und die Extraktion effektiver verlaufen. Für weitere Versuche wird eine Temperatur von 60 °C aufgrund höherer Ausbeuten als Standard festgelegt.

### 3.1.2.3 Ausbeute in Abhängigkeit vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss

Vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss hängt bei der Extraktion sowohl die CO<sub>2</sub>-Gesamtmenge ab, die für die Extraktion zur Verfügung steht, als auch die Geschwindigkeit, mit der das überkritische Lösemittel durch das zu extrahierende Gut strömt. An der Extraktionsanlage ist der Massenfluss nach unten hin durch den Pumpenhub der Hochdruckpumpe zur CO<sub>2</sub>-Förderung auf ca. 1 kg/h CO<sub>2</sub> begrenzt. Bei einem Massenfluss über 15 kg/h bildet sich die CO<sub>2</sub>-Flüssigphase im Separator zu schnell aus, sodass die Heizung des Behälters nicht mehr in der Lage ist genug CO<sub>2</sub> in die Gasphase zu überführen und ein Überlaufen der Flüssigphase in den CO<sub>2</sub>-Tank droht. Die konventionelle Extraktion über Abscheidung des Extraktes im Separator wird für den Massenfluss auf zwei Niveaus getestet und mit dem Massenfluss im RESS-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Verfahren verglichen. Sämtliche Versuche laufen bei 350 bar und 60 °C über 3 h. Für das mittlere und hohe Massenflussniveau ergeben sich CO<sub>2</sub>-Dichten von 854,1 ± 1,0 kg/m<sup>3</sup> und 850,2 ± 2,0 kg/m<sup>3</sup>. Im unteren Grenzbereich des Massenflusses, bei Anwendung des RESS-Verfahrens, ist ein leichter Anstieg der Dichte auf 891,2 ± 7,2 kg/m<sup>3</sup> zu verzeichnen. Will man Ausbeuten des RESS-Verfahrens mit denen der klassischen Extraktion vergleichen, so sollte man beachten, dass sich durch die unterschiedliche Geometrie der Abscheidebehälter geringfügige Abweichungen durch die Entnahme der Extrakte ergeben können. Diese sind quantitativ allerdings nicht zu erfassen und werden an dieser Stelle vernachlässigt.

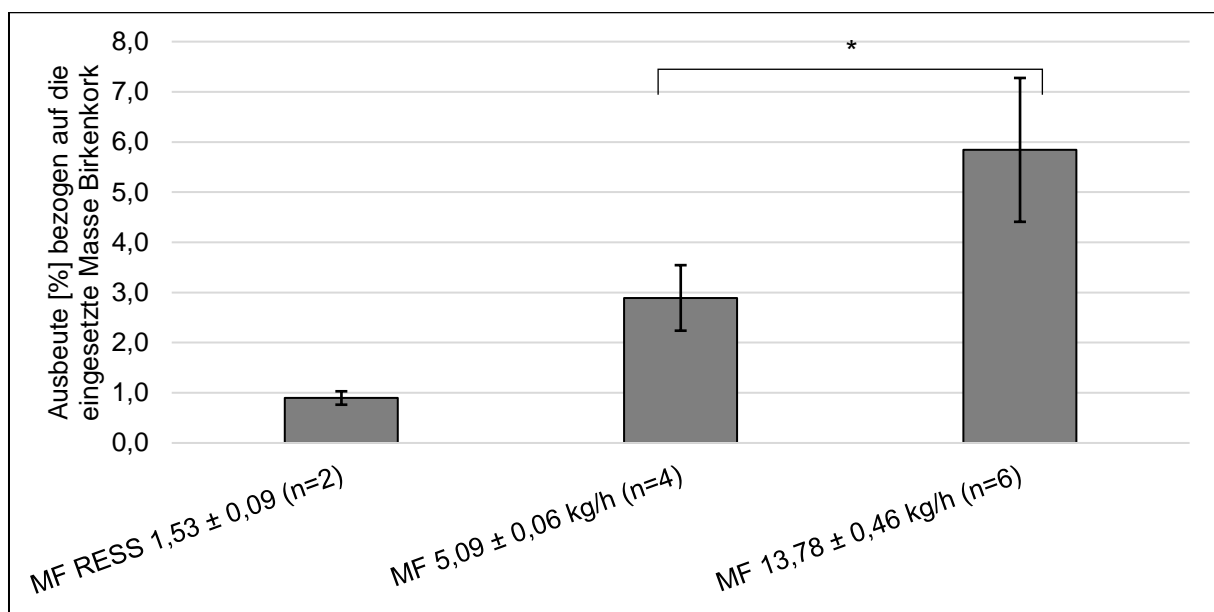


Abbildung 12: Abhängigkeit der Ausbeute von CO<sub>2</sub>-Massenfluss (MF) bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub> (MW ± R; MW ± SD)

Abbildung 12 verdeutlicht die Abhängigkeit der Ausbeute vom CO<sub>2</sub>-Massenfluss. Wird ein möglichst hoher Massenfluss gewählt (~14 kg/h), so erhält man durchschnittliche Ausbeuten von fast 6 %. Reduziert man den Massenfluss auf 5 kg/h, liegt die Ausbeute bei nicht einmal 3 %. Beim RESS-Verfahren im unteren Grenzbereich des Massenflusses (~1,5 kg/h) ergeben sich Ausbeuten unter 1 % bezogen auf die Ausgangsmasse. Insgesamt folgt die Abhängigkeit der Ausbeute vom Massenfluss einem linearen Trend ( $R^2 = 0,982$ ). Eine langsamere CO<sub>2</sub>-Strömung durch das Extraktionsgut bringt somit keinen Vorteil für die Ausbeute. Die Gleichgewichtseinstellung beim Extraktionsvorgang scheint dementsprechend schnell erreicht zu sein. Dies kann darauf hindeuten, dass Auswaschprozesse bei dieser Extraktion eine größere Rolle spielen als Diffusionsvorgänge aus der Pflanzenmatrix,

die üblicherweise mehr Zeit zum Erreichen des Equilibriums benötigen. Im stark zerkleinerten Pflanzenmaterial sind viele Zellen bereits aufgebrochen, und die in der Zelle lokalisierten Stoffe können leicht gelöst werden. Hierfür ist der fehlende Diffusionswiderstand der Zellwand verantwortlich. Der höhere Durchsatz mit frischem Lösemittel bei größerem Massenfluss begünstigt sowohl Extraktion durch Auswaschen als auch durch Diffusion, und verhindert eine Sättigung mit Extraktivstoffen. Um die Vorgänge bei der Extraktion in Abhängigkeit von der Extraktionszeit zu untersuchen, werden unter 3.1.2.4 fraktionierte Extraktionen desselben Materials durchgeführt. Für eine hohe Ausbeute sollte also der für das jeweilige Verfahren maximal mögliche Massenfluss gewählt werden.

### **3.1.2.4 Ausbeute bei fraktionierter Extraktion (Extraktionszeit)**

Da keine kontinuierliche Entnahme des Extraktes aus den Druckbehältern möglich ist, wird das Extraktionsverhalten über die Zeit durch fraktionierte Extraktion untersucht. Dasselbe Material wird bei Standardbedingungen (350 bar; 60 °C) in Intervallen von jeweils 3 h extrahiert. Zwischen den einzelnen Fraktionen wird der Druck im Extraktionsbehälter abgelassen und das Ausgangsmaterial durchmischt. Die mittlere CO<sub>2</sub>-Dichte liegt für Extraktionsversuche mit Abscheidung im Separator bei  $852,1 \pm 3,0 \text{ kg/m}^3$ , bei der Versuchsreihe im RESS-Verfahren beträgt sie  $888,6 \pm 8,4 \text{ kg/m}^3$ . Konventionelle- und RESS-Extraktion unterscheiden sich im CO<sub>2</sub>-Massenfluss. Für die RESS-Extraktionen liegt der durchschnittliche Massenfluss bei  $1,5 \pm 0,2 \text{ kg/h}$ , während bei klassischer Extraktion Werte von  $13,9 \pm 0,9 \text{ kg/h}$  erreicht werden. Abbildung 13 zeigt die Ausbeute der ersten drei Fraktionen, bezogen auf die eingesetzte Menge an Ausgangsmaterial. Auffällig ist, dass bei Abscheidung im Separator nach einer hohen Ausbeute von  $4,28 \pm 1,42 \%$  in Fraktion 1 die Ausbeute für die folgenden Fraktionen deutlich auf  $0,79 \pm 0,41 \%$  bzw.  $0,57 \pm 0,41 \%$  absinkt. Das Abfallen der Ausbeute nach der ersten Fraktion fällt beim RESS-Verfahren weniger drastisch aus. Hier sinkt die Ausbeute von  $0,90 \pm 0,10 \%$  in Fraktion 1, über  $0,44 \pm 0,09 \%$  in Fraktion 2 auf  $0,26 \pm 0,06 \%$  in Fraktion 3 und folgt einem beinahe linearen Verlauf mit einem Bestimmtheitsmaß der Regression von 0,942. Die geringere Ausbeute im RESS-Verfahren kann mit dem verfahrensbedingt niedrigeren Massenfluss begründet werden. Um beide Verfahren besser vergleichen zu können, wird in Abbildung 13 auch der Anteil der jeweiligen Fraktion an der Gesamtausbeute

### 3 Ergebnisse und Diskussion

der beiden Verfahren über die drei Fraktionen dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die erste Fraktion im Separator-Verfahren mit 76,6 % deutlich höher ausfällt als die erste Fraktion des RESS-Verfahrens mit 56,4 %.

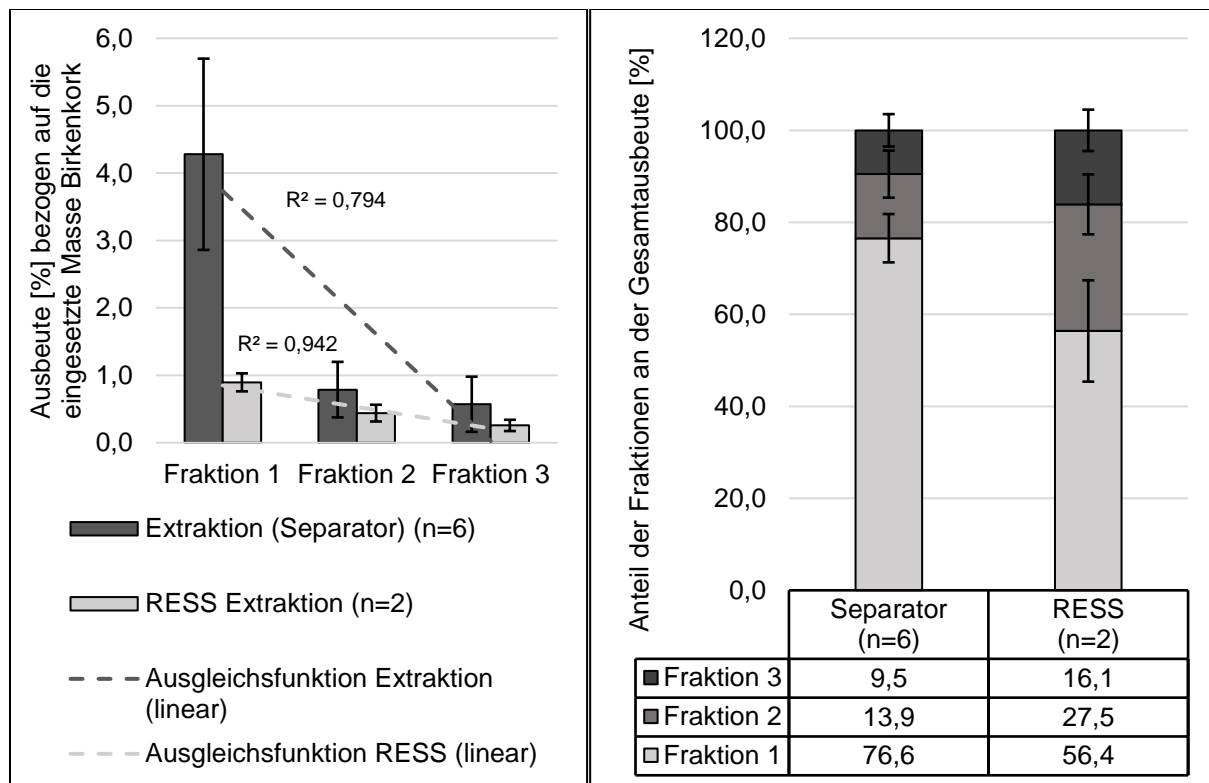


Abbildung 13: Verlauf der Ausbeute bei dreifach fraktionierter Extraktion von Birkenkork im Separator- und RESS-Verfahren und Verteilung der Ausbeute auf die einzelnen Fraktionen ( $MW \pm R$ ;  $MW \pm SD$ )

Sowohl der lineare Abfall der Ausbeute beim RESS-Verfahren, bei gleichzeitig geringer Gesamtausbeute, als auch die stark verminderte Ausbeute bei der Separator Methode nach der ersten Fraktion sind Hinweise auf ein erleichtertes Auswaschen aufgebrochener Zellen während des frühen Extraktionsprozesses durch höheren  $CO_2$ -Massenfluss. Das Ende des Auswaschprozesses wäre demnach bei der klassischen Extraktion bereits während der ersten drei Stunden erreicht und die geringeren Ausbeuten der folgenden Fraktionen durch die langsamere Diffusion der Extraktivstoffe durch die Pflanzenmatrix bedingt. Somit sollte beim RESS-Verfahren die lineare Abnahme der Ausbeute noch in dieser Auswaschphase liegen. Abbildung 14 zeigt, dass bei weiterer Extraktion im RESS-Verfahren ein Plateau für die Ausbeute erreicht wird. Dieses Plateau ist ein Anzeichen dafür, dass hier nun ebenfalls die Auswaschphase beendet ist, und die folgenden Fraktionen hauptsächlich durch Diffusion gewonnen werden.



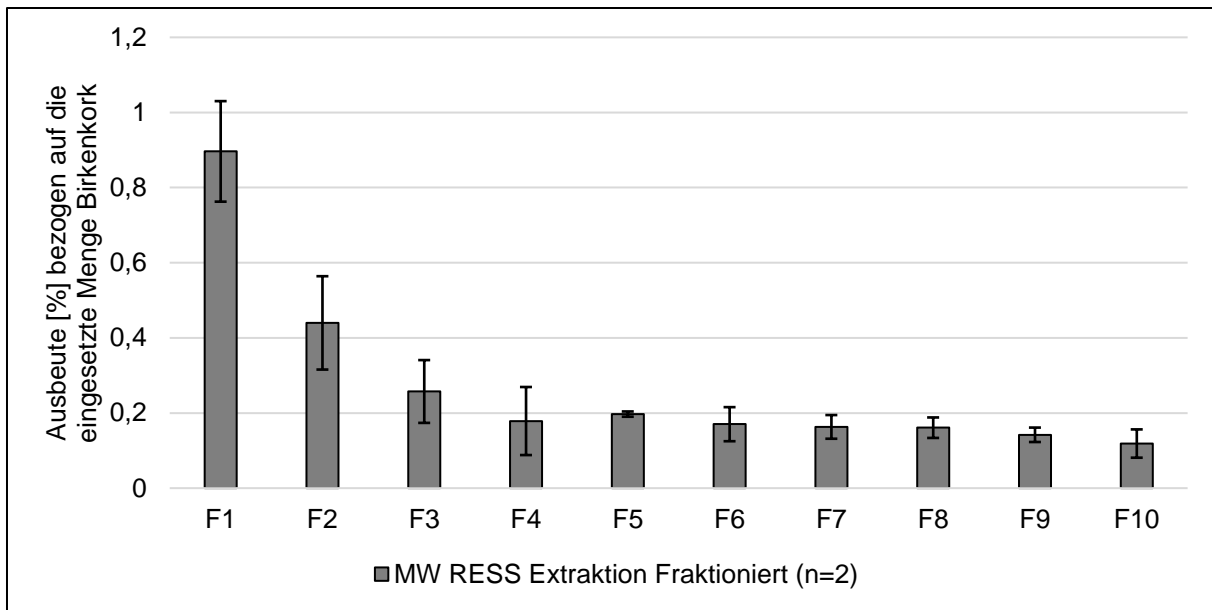


Abbildung 14: Verlauf der Ausbeute bei zehnfach fraktionierter Extraktion von Birkenkork (F1-F10) im RESS-Verfahren ( $MW \pm R$ )

Gegen Ende der Versuchsreihe sinken die Ausbeuten weiter ab, was auf eine Erschöpfung des Prozesses hindeutet. Summiert man die absoluten Ausbeuten der ersten drei RESS-Fractionen auf, so erhält man  $\sim 3,2$  g. Derartige Werte werden auch bei klassischer Extraktion während der ersten Fraktion erreicht. Die ersten drei RESS-Fractionen bzw. die erste Fraktion bei herkömmlicher Extraktion entsprechen also einem leicht extrahierbaren Extraktanteil, während folgende Chargen nur noch geringere Ausbeuten versprechen. Eine Extraktionszeit von drei Stunden ist im klassischen Verfahren also ausreichend, um eine akzeptable Ausbeute zu erreichen.

### 3.1.2.5 Einfluss der Chargengröße auf die Extraktionsausbeute

Die Versuche zur Optimierung der Extraktionsausbeute werden im kleinen Maßstab mit 50 g Birkenkork als Ausgangsmaterial durchgeführt. Für die Produktion größerer Chargen an Extrakt ist das Scale up Verhalten von großer Bedeutung. Neben einer Veränderung der Extrakteigenschaften, kann eine Vergrößerung des Produktionsmaßstabes auch Einfluss auf die Ausbeute haben. Daher werden Versuche mit jeweils verdoppelter Ausgangsmasse an Birkenkork durchgeführt, um den Einfluss der Chargengröße auf die Ausbeute zu untersuchen. Somit betragen die untersuchten Chargengrößen 50 g, 100 g und 200 g. Die einzelnen Chargen werden für 3 h bei 350 bar und 60 °C extrahiert. Um die Extraktionen vergleichen zu können, werden sowohl der  $CO_2$ -Massenfluss als auch die  $CO_2$ -Dichte in engen Grenzen

### 3 Ergebnisse und Diskussion

gehalten:  $MF = 10,0\text{-}13,2 \text{ kg/h}$ ;  $\rho = 845,3\text{-}850,6 \text{ kg/m}^3$ . In Abbildung 15 ist zu sehen, dass eine Verdopplung der Ausgangsmasse an Birkenkork mit einer Steigerung der absoluten Ausbeute einhergeht. Allerdings bewirkt die vierfache Menge an Birkenkork nicht einmal eine Verdopplung der Ausbeute (Anstieg von  $3,9 \pm 0,5 \text{ g}$  auf  $7,4 \pm 0,8 \text{ g}$ ). Dementsprechend sinkt die prozentuale Ausbeute von  $7,8 \pm 1,1 \%$  bei 50 g Ausgangsmaterial, über  $5,4 \pm 0,3 \%$  bei 100 g, auf  $3,7 \pm 0,4 \%$  bei 200 g.

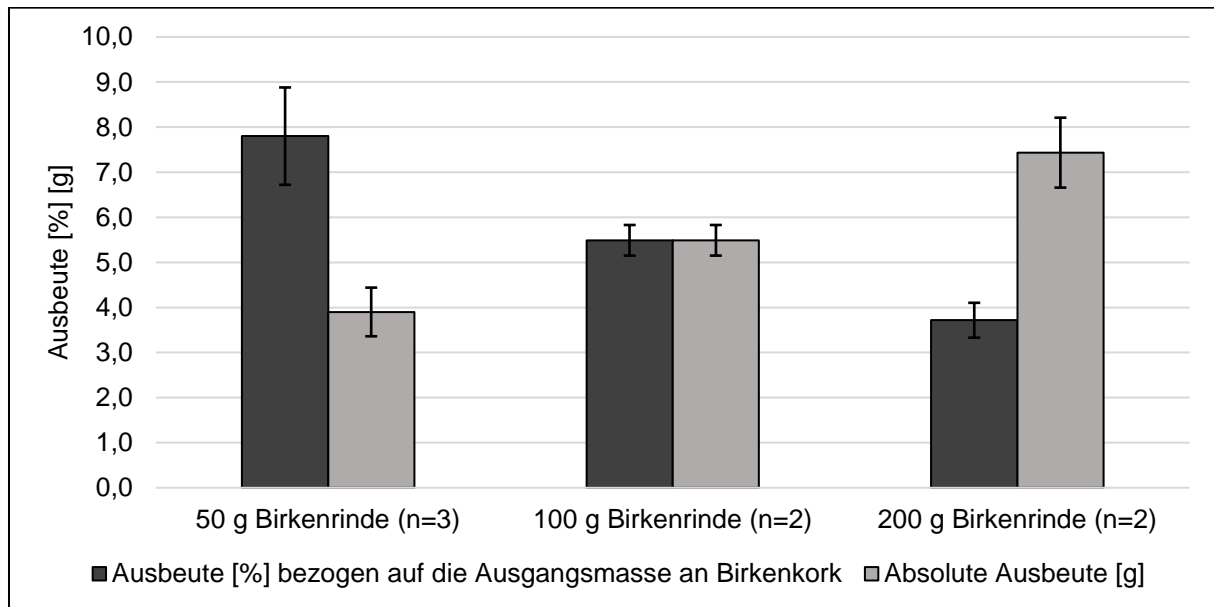


Abbildung 15: Ausbeute bei der Extraktion verschiedener Ausgangsmassen Birkenkork mit überkritischem  $\text{CO}_2$  ( $MW \pm R$ ;  $MW \pm SD$ )

Die Effektivität der Extraktion nimmt also mit steigender Chargengröße ab, was für eine Sättigung des Extraktionsmittels bei den gegebenen Bedingungen spricht. Um diesem Effekt entgegenzuwirken und die Ausbeute auch bei größeren Chargen zu maximieren, wäre eine Steigerung des  $\text{CO}_2$ -Durchsatzes nötig. Dies könnte entweder durch längere Extraktionszeiten oder durch eine Erhöhung des  $\text{CO}_2$ -Massenflusses realisiert werden.

#### 3.1.2.6 Einfluss des Extraktor-Setups auf die Extraktionsausbeute

Wie unter 2.2.1.2.2 beschrieben, könnte es bei losem Einfüllen des Birkenkorks in den Extraktor B<sub>5</sub> im Laufe der Extraktion zu einer Dochtbildung und somit einer verminderten Effizienz des Extraktionsprozesses kommen. Die Dochtbildung könnte durch Mischen des Ausgangsmaterials mit Glaskugeln und einer Fixierung des Gemischs im Extraktor verhindert werden (Abbildung 8). Durch die Glaskugeln wird das Volumen des Extraktionsbetts vergrößert. Das Beschweren dieses Gemisches

aus Glaskugeln und Birkenkorkextrakt sorgt für eine feste Einbettung des Birkenkorks zwischen den Glaskugeln, was die Bildung von CO<sub>2</sub>-Kanälen verhindern kann. Um diese Effekte zu untersuchen, werden Versuche unter Standardbedingungen (Tabelle 14) mit und ohne Fixierung durchgeführt und die Ausbeuten unter Abbildung 16 dargestellt. Die durchschnittlichen Ausbeuten unterscheiden sich bei beiden Setups mit  $7,8 \pm 1,1$  % bei Fixierung und  $5,8 \pm 1,4$  % ohne Fixierung nicht signifikant. Eine Fixierung des Ausgangsmaterials im Extraktor führt bei der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub> unter den gegebenen Bedingungen nicht zu einer Steigerung der Ausbeute und eine Dochtbildung ohne Fixierung ist somit nicht zu erwarten.

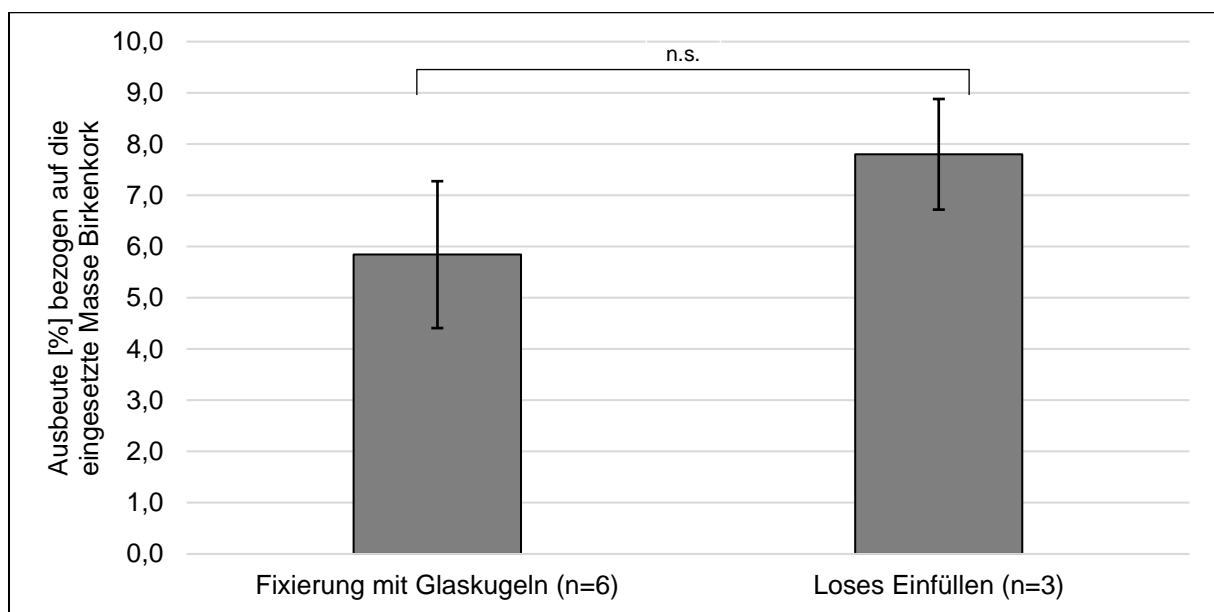


Abbildung 16: Ausbeute bei verschiedenen Setups im Extraktor: Ausgangsmaterial mit Glaskugeln vermischt und mit einem Gewicht fixiert gegen loses Einfüllen des Birkenkorks (MW ± SD)

### 3.1.2.7 Ausbeute bei Vorinkubation des Birkenkorks mit CO<sub>2</sub>

Eine Vorinkubation des Birkenkorks in CO<sub>2</sub> vor der eigentlichen Extraktion könnte, bedingt durch die längere Equilibrierungszeit, eine Steigerung der Ausbeute ermöglichen. Prinzipiell können dabei zwei Arten der Inkubation realisiert werden. Bei der Befüllung des Extraktors mit überkritischem CO<sub>2</sub> und anschließendem Abschalten der Anlage bei geschlossenem Extraktor, sinkt der auf 350 bar eingestellte Druck im Laufe der Abkühlung des Extraktors (60 °C auf Raumtemperatur (~22 °C)) auf 60 bar ab. Unter diesen Bedingungen bewegt man sich im Bereich der Siedekurve des Phasendiagramms von CO<sub>2</sub>. Hier liegt somit eine Phasentrennung mit einer CO<sub>2</sub>-Flüssigphase im unteren Bereich und einer CO<sub>2</sub>-Gasphase im oberen Bereich des

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Extraktors vor. Die Inkubation erfolgt also bei unterkritischen Bedingungen mit Lokalisation des Birkenkorks in flüssigem CO<sub>2</sub>. Anschließend an eine 72-stündige Inkubation erfolgt die Extraktion unter Standardbedingungen (Tabelle 14). Als weitere Inkubationsmethode besteht die Möglichkeit die Beheizung des Extraktors nach Beaufschlagung mit überkritischem CO<sub>2</sub> über den gewünschten Zeitraum aufrecht zu erhalten. Die Inkubation erfolgt hier demnach im überkritischen Bereich bei 350 bar und 60 °C. Für diesen Versuch wird eine Inkubationszeit von 24 h mit anschließender Standardextraktion angesetzt.

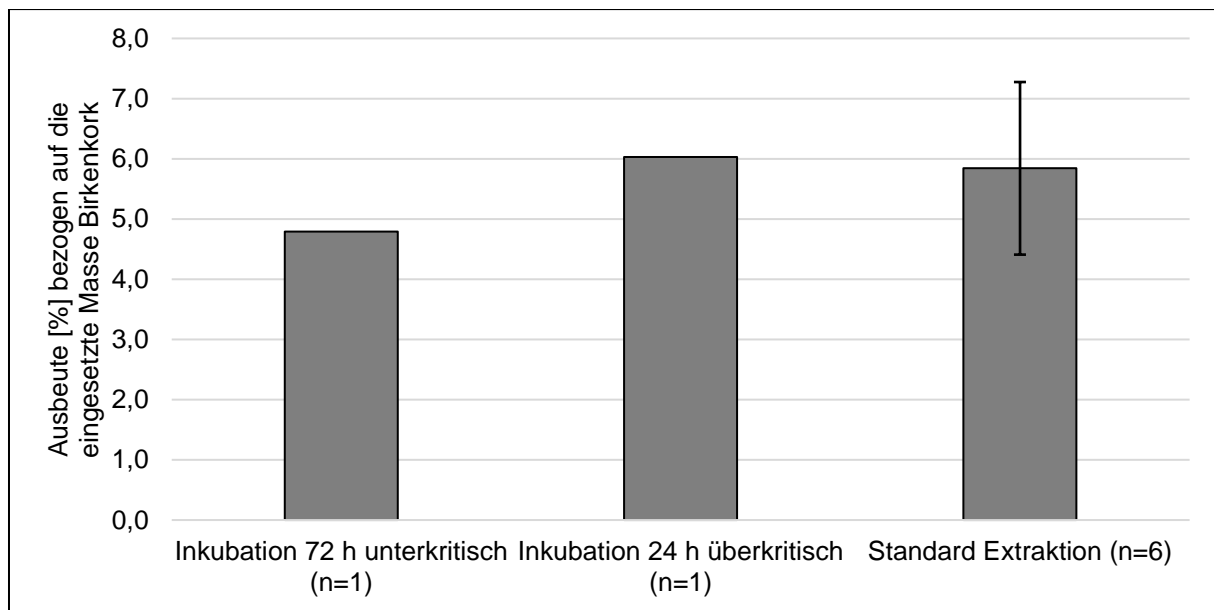


Abbildung 17: Extraktionsausbeute bei vorhergehender Inkubation des Birkenkorks in CO<sub>2</sub> (Standardextraktion beschrieben unter 3.1.2.1 - 3.1.2.3)

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass keine der beiden Inkubationsmethoden einen Hinweis auf eine Steigerung der Ausbeute liefert. Sowohl bei unterkritischer als auch bei überkritischer Inkubation liegen die Ausbeuten mit 4,8 % bzw. 6,0 % im Bereich der Standardabweichung der Standardmethode. Eine Aufsättigung des CO<sub>2</sub> mit Extraktivstoffen bei längeren Standzeiten im Extraktionsmittel ist demnach nicht zu erwarten. Auf weitere Inkubationsversuche wird daher verzichtet.

#### 3.1.2.8 Einfluss der Separator-Entspannung auf die Ausbeute

Beim Ablassen des Drucks aus dem Separator B<sub>2</sub> ist es möglich das Ventil (V<sub>16</sub>) schlagartig zu öffnen, um ein schnelles Ausfallen der Extrakte unter Trockeneisbildung zu erreichen.

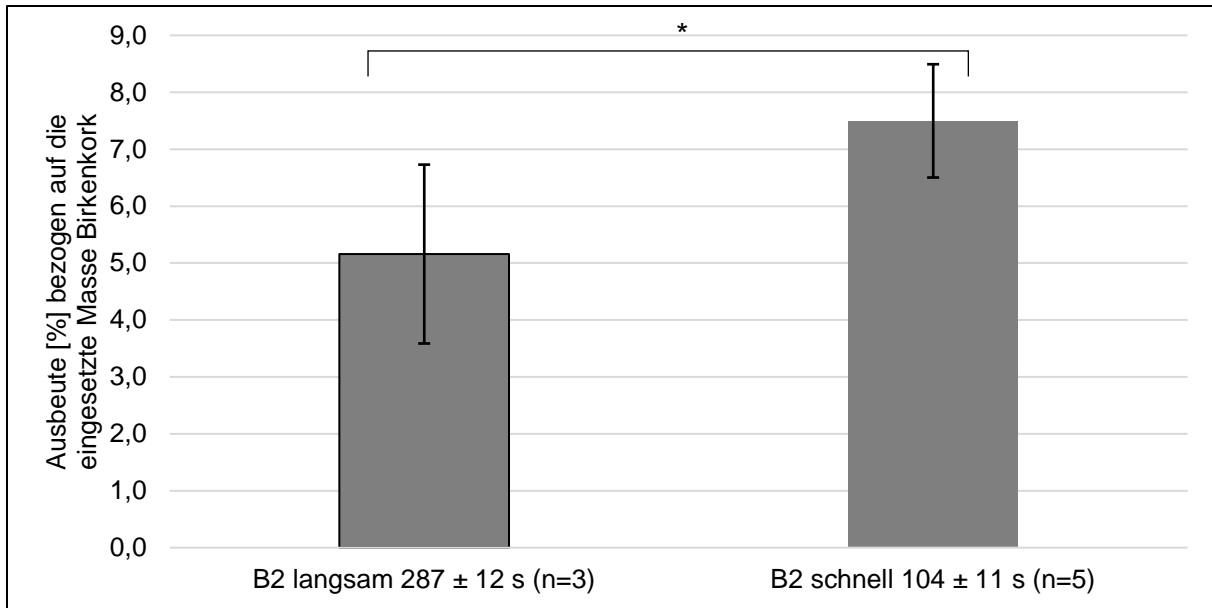


Abbildung 18: Ausbeute der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem  $\text{CO}_2$  bei unterschiedlichen Separator-Entspannungsgeschwindigkeiten ( $MW \pm SD$ )

Die schnelle Entspannung von 40 bar auf Umgebungsdruck nimmt  $\sim 100$  s in Anspruch. Zur Vermeidung von Trockeneis kann das Ablassen auch unter vorsichtigem Öffnen des Ventils über einen Zeitraum von  $\sim 5$  min erfolgen. Bei schnellem Öffnen des Ventils könnte die Gefahr bestehen, dass Extrakt mitgerissen wird, über die Abluftleitung verloren geht und die Ausbeute dadurch geringer ausfällt. In Abbildung 18 sind die Ausbeuten für beide Methoden dargestellt. Es ist zu erkennen, dass sich die Werte für beide Methoden mit  $5,2 \pm 1,6$  % für langsames und  $7,5 \pm 1,0$  % für schnelles Ablassen signifikant unterscheiden ( $p = 0,04$ ). Dies zeigt, dass durch schnelles Ablassen des Drucks keine zusätzlichen Verluste an Ausbeute zu erwarten sind und dies eher beim langsamen Ablassen auftreten kann. Eine mögliche Begründung dafür ist der Einschluss des Extraktes im Trockeneis beim schnellen Entspannungsvorgang. Beim langsamen Druckablass ist die Wahrscheinlichkeit, dass Extraktpartikel mitgerissen werden somit größer.

### 3.1.3 Ausbeute und Temperaturerfassung bei verschiedenen Setups der RESS-Extraktion

Ein Vergleich der Ausbeuten bei der RESS-Extraktion im top- und bottom spray Verfahren über zehn Fraktionen unter Standardbedingungen (Tabelle 14) in Abbildung 19 zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Methoden. Weder die Lokalisation der RESS-Düse im Abscheidebehälter noch der unterschiedliche

### 3 Ergebnisse und Diskussion

apparative Aufbau haben demnach einen Einfluss auf die Ausbeute bei der RESS-Extraktion.

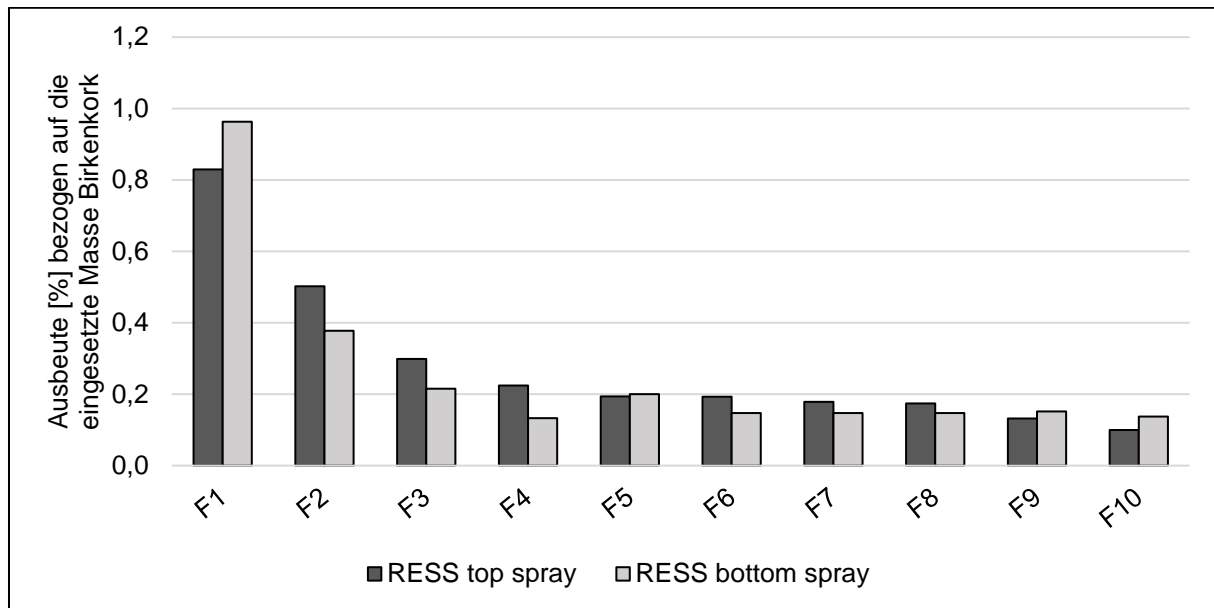


Abbildung 19: Vergleich der Ausbeuten bei verschiedenen Setups der fraktionierten (F1-F10) RESS-Extraktion von Birkenkork

Bei der Durchführung beider Methoden ergeben sich jedoch Unterschiede hinsichtlich der Temperaturerfassung. Im top spray Verfahren bietet es sich an, einen Glaszylinder als zusätzlichen Abscheidebehälter in die Metallfritte einzubringen. Dieser ist leicht zu entnehmen und erleichtert somit die Gewinnung des Extraktes. In der Metallfritte abgeschiedener Extrakt ist bei diesem Setup zu vernachlässigen, da sich diese Verluste auf den einstelligen Milligrammbereich beschränken. Die Temperaturerfassung in diesem Setup kann über eine Sonde im Deckel des Behälters realisiert werden. Der zusätzliche Thermofühler im Boden von B<sub>6</sub> liefert keine relevanten Messwerte, da er vom Glaszylinder abgeschirmt wird (Abbildung 9 b). Im bottom spray Verfahren sind über den im Deckel lokalisierten Thermofühler keine Temperaturschwankungen messbar, da der Abstand zwischen Sensor und Düse zu groß ist. Durch direktes Sprühen in die Metallfritte, ohne Glaszylinder, gelingt hier die Temperaturerfassung über den Sensor im Boden von B<sub>6</sub> (Abbildung 9 c). Da die Abschirmung durch die Metallfritte alleine nicht so stark ausfällt, ist eine Steuerung des Prozesses, wenn auch leicht verzögert, möglich. Prinzipiell ist jedoch das top spray Verfahren aufgrund der besseren Temperaturerfassung und der erleichterten Entnahme der Extrakte dem bottom spray Verfahren vorzuziehen.

### 3.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Extraktion von Birkenkork mit überkritischem CO<sub>2</sub>

Die Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid im Labormaßstab ist an der verwendeten Extraktionsanlage sowohl im klassischen als auch im RESS-Verfahren realisierbar. Extraktionsbedingungen, die eine gute Ausbeute versprechen, sind in Tabelle 14 aufgeführt und werden als Standardbedingungen zum Vergleich einzelner Versuche festgelegt.

*Tabelle 14: Standardbedingungen für die Extraktion von Birkenkork mit überkritischem Kohlendioxid*

<b>Parameter</b>	<b>Standardwert</b>
Extraktionsdruck	350 bar
Extraktionstemperatur	60 °C
CO <sub>2</sub> -Massenfluss	12-15 kg/h (1-2 kg/h bei RESS)
Extraktionszeit	3 h
Resultierende CO <sub>2</sub> Dichte	~850 kg/m <sup>3</sup> (~900 kg/m <sup>3</sup> bei RESS)

Unter diesen Standardbedingungen wird im klassischen Extraktionsverfahren eine durchschnittliche Ausbeute von  $5,8 \pm 1,4$  % bezogen auf die Ausgangsmasse an Birkenkork erreicht. Bei einem durchschnittlichen Triterpengehalt in Birkenrinde von 18,7 % [19] entspricht dies einem in diesem Verfahren extrahierbaren Anteil von ca. einem Drittel. Die Ausbeute wird dabei stark von der CO<sub>2</sub>-Dichte, bedingt durch Druck und Temperatur, beeinflusst. Hohe Ausbeuten werden bei einer Dichte um 850 kg/m<sup>3</sup> bei 350 bar und 60 °C erreicht. Der Einfluss des CO<sub>2</sub>-Durchsatzes auf die Ausbeute zeigt sich insbesondere beim Vergleich zwischen der klassischen Extraktionsmethode und dem RESS-Verfahren. Durch den limitierten Massenfluss im RESS-Verfahren von 1-2 kg/h sind hier lediglich Ausbeuten von knapp 1 % möglich. Bei erneuter Extraktion desselben Materials, nimmt die Ausbeute nach der ersten Fraktion rasch ab, sodass eine Extraktionszeit von 3 h ausreichen erscheint. Eine erhöhte Chargengröße liefert zwar größere absolute Ausbeuten, die Effektivität und damit die prozentuale Extraktionsausbeute sinkt aber mit steigender Ausgangsmasse. Lediglich geringen Einfluss auf die Ausbeute haben eine Vorinkubation des Birkenkorks mit CO<sub>2</sub> und eine Fixierung des Ausgangsmaterials im Extraktor zusammen mit Glaskugeln. Die zum

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Teil großen Standardabweichungen der Ausbeute zwischen Versuchen mit gleichen bzw. ähnlichen Parametern können unter anderem durch die Entnahme der Extrakte aus dem Separator bedingt sein. Je nach Beschaffenheit des Extraktes kann der im Separator verbleibende Rest bei der manuellen Entnahme leicht variieren.



### 3.2 Zusammensetzung der hergestellten Triterpentrockenextrakte aus Birkenrinde

Die Triterpenzusammensetzung kann die Eigenschaften von Birkenkorkextrakten stark beeinflussen. Da das Gelstabilisierungsvermögen der Extrakte hauptsächlich auf Betulin zurückgeführt wird, könnte ein zu niedriger Betulingehalt die Gelbildung negativ beeinflussen. Veränderte Konzentrationen der Begleitsubstanzen könnten auch einen Einfluss auf die Gelstabilisierung haben. Für die pharmakologische Wirkung der Extrakte ist die Zusammensetzung ebenfalls von Bedeutung, da die verschiedenen Triterpene unterschiedliche Effekte im menschlichen Körper hervorrufen (Tabelle 1). Der Gehalt von fünf Triterpenen (Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol) in den Extrakten aus überkritischer Fluidextraktion wird daher mit Hilfe der unter 2.2.2 beschriebenen HPLC-Methode untersucht. Als Referenz dienen Extrakte aus Lösemittlextraktion (TE1 und TE2 (Birken AG)) mit folgender Zusammensetzung:

Tabelle 15: Triterpenzusammensetzung von Lösemittlextrakten (Birken AG)

Substanz	Gehalt TE1 [%] (GC Methode Birken AG)	Gehalt TE1 [%] (HPLC n=3)	Gehalt TE2 [%] (HPLC n=3)
Betulin	81,60	82,29 ± 0,69	81,97 ± 1,19
Betulinsäure	3,84	3,99 ± 0,03	3,71 ± 0,05
Oleanolsäure	0,97	0,98 ± 0,01	1,02 ± 0,01
Erythrodiol	1,05	1,68 ± 0,01	1,80 ± 0,03
Lupeol	2,08	4,31 ± 0,04	4,48 ± 0,05
Sonstige	10,46	6,75 ± 0,74	7,02 ± 1,32

#### 3.2.1 Vergleich der Triterpenzusammensetzung bei unterschiedlichen Extraktionsmethoden

In Abbildung 20 ist die Zusammensetzung von Extrakten aus unterschiedlichen Herstellungsmethoden dargestellt. Acht überkritische Fluidextrakte, mit Abscheidung im Separator, werden mit zwei RESS-Extrakten und zwei Lösemittlextrakten (Heptan) verglichen. Die Herstellung der RESS-Extrakte erfolgt analog der Standardextraktion, mit Ausnahme des geringeren Massenflusses. Im Betulingehalt unterscheiden sich die

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Extrakte aus verschiedenen Herstellungsmethoden deutlich. Mit  $82,13 \pm 0,32$  % weisen die Lösemittlextrakte den höchsten Betulingehalt auf. Standardextraktion mit überkritischem  $\text{CO}_2$  liefert einen niedrigeren Wert mit einem durchschnittlichen Gehalt von  $68,48 \pm 2,86$  %. Auffällig ist vor allem der niedrige Betulin Wert ( $24,36 \pm 6,33$  %) bei der RESS-Extraktion.

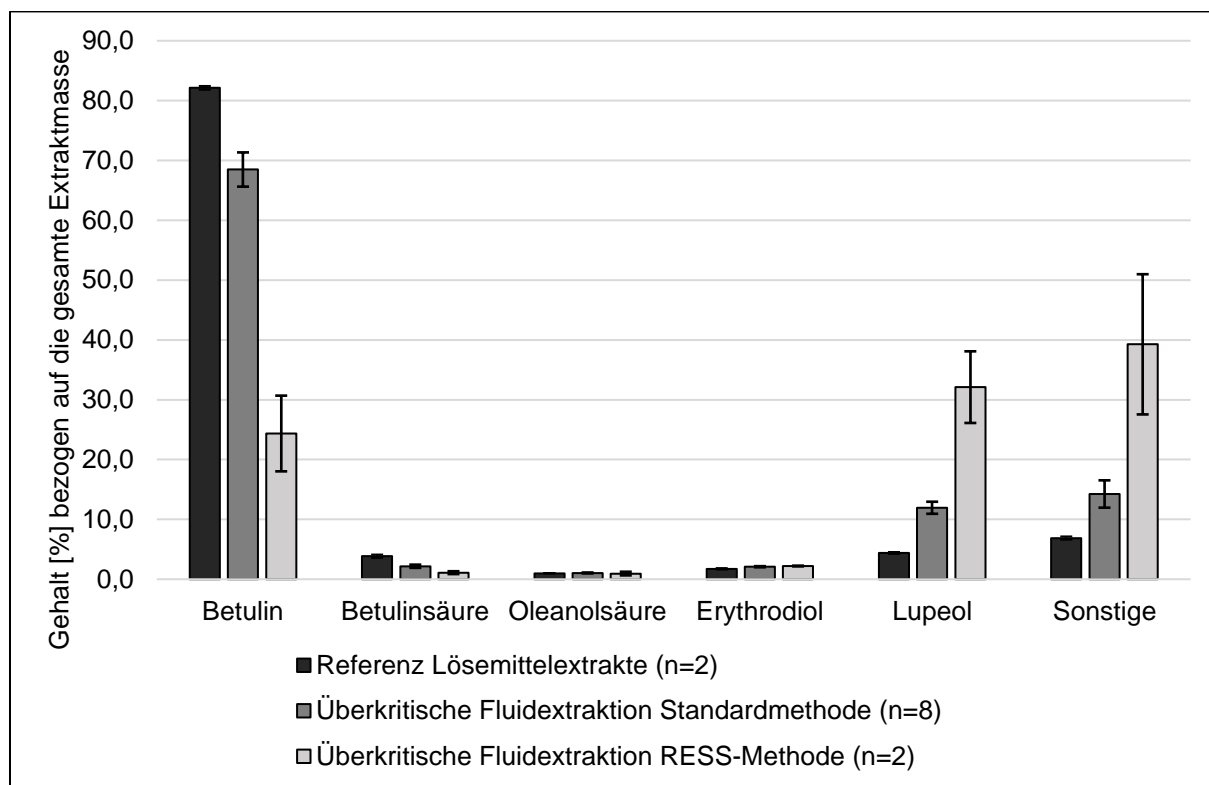


Abbildung 20: Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten bei unterschiedlichen Extraktionsmethoden ( $MW \pm SD$ ;  $MW \pm R$ )

Beide Methoden unter Nutzung von überkritischen Fluiden weisen, verglichen mit den Referenzextrakten ( $4,39 \pm 0,16$  %), einen deutlich höheren Lupeolanteil von  $11,95 \pm 1,01$  % bzw.  $32,11 \pm 5,99$  % (RESS) auf. Auch die Extraktion nicht identifizierter Substanzen ist vor allem bei Anwendung des RESS-Verfahrens deutlich stärker ausgeprägt. Unter den gegebenen Extraktionsbedingungen findet bei der Verwendung von überkritischem  $\text{CO}_2$  also eine Verschiebung in der Zusammensetzung von Betulin hin zu Lupeol und sonstigen Substanzen statt. Der geringere Massenfluss im RESS-Verfahren steigert diesen Effekt zusätzlich. Lupeol weist in seiner Strukturformel im Vergleich zu Betulin eine Hydroxyl-Gruppe weniger auf. Die dadurch erhöhte Lipophilie des Moleküls sorgt für eine gute Löslichkeit im apolaren Extraktionsmittel  $\text{CO}_2$ . Bei geringem  $\text{CO}_2$  Massenfluss und längerer Equilibrierungszeit lässt sich somit ein mit Lupeol angereicherter Extrakt herstellen. Es

sind also nicht nur Unterschiede bezüglich des Lösemittels beim Vergleich zwischen Heptan und überkritischem CO<sub>2</sub> zu erwarten, sondern die Extraktionsbedingungen scheinen einen wesentlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte zu haben. Unter 3.2.2 wird daher der Einfluss verschiedener Extraktionsparameter auf die Zusammensetzung untersucht. Der Einfluss der Extraktionsmethode auf Substanzen, die nur in kleinen Mengen vorhanden sind (Betulinsäure, Oleanolsäure und Erythrodiol), ist nur gering ausgeprägt. Lediglich der Anteil an Erythrodiol ist bei überkritischer Fluidextraktion leicht erhöht, wogegen der Gehalt an Betulinsäure leicht erniedrigt ist. Die Eigenschaften der Extrakte hinsichtlich ihrer Fähigkeit Gele und Cremes zu stabilisieren sollten von den Hauptbestandteilen Betulin und Lupeol sowie den nicht identifizierten Substanzen abhängen.

### **3.2.2 Einfluss der Extraktionsparameter auf die Zusammensetzung von Triterpentrockenextrakten aus Birkenrinde**

Durch Variation der wesentlichen Extraktionsparameter Druck, Temperatur und CO<sub>2</sub> Massenfluss soll deren Einfluss auf die Konzentration der Hauptbestandteile Betulin und Lupeol sowie der nicht identifizierten Substanzen untersucht werden. Die im Zuge der Optimierung der Ausbeute hergestellten Extrakte (3.1.2) werden dazu weiter untersucht. Eine Verschiebung hin zu einem höheren Gehalt an Lupeol und nicht identifizierten Substanzen, zulasten der Betulinkonzentration, ist in Abbildung 21 für eine Veränderung aller Extraktionsparameter zu erkennen. Die Reduktion des Extraktionsdruckes, der Extraktionstemperatur und des CO<sub>2</sub> Massenflusses bedingt einen Betulinanteil von knapp über 50 %. Diese Veränderung in der Zusammensetzung geht bei allen drei Extraktionsparametern mit einer verminderten Extraktionsausbeute (Vgl. 3.1.2) einher. Bei geringerer Effektivität der Extraktion, also langsamerem Übergang der Extraktivstoffe ins Extraktionsmedium, werden Lupeol und unbekannte Substanzen bevorzugt. Durch gezielte Veränderung der Extraktionsparameter ist es also möglich, Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte zu nehmen und bestimmte Triterpene anzureichern.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

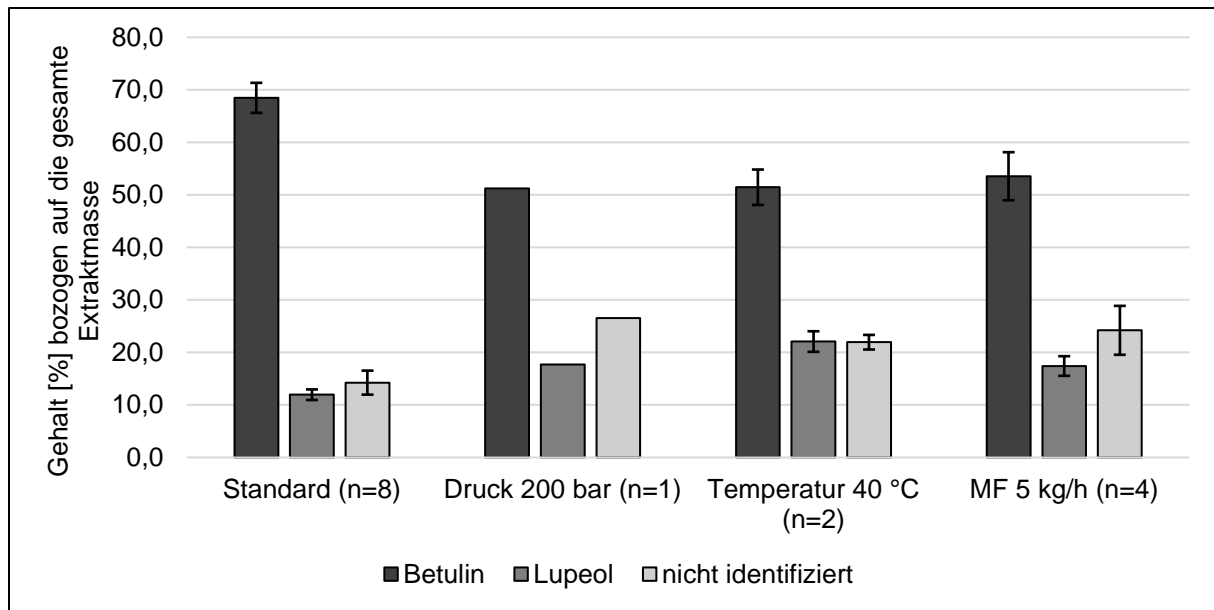


Abbildung 21: Einfluss von Druck, Temperatur und Massenfluss auf die Zusammensetzung der Hauptbestandteile von Triterpentrockenextrakten bei Extraktion mit überkritischem CO<sub>2</sub>

#### 3.2.3 Triterpenzusammensetzung bei fraktionierter Extraktion

Um gezielt Extrakte mit definiertem Gehalt an Betulin und Lupeol herzustellen, wird im RESS-Verfahren dasselbe Ausgangsmaterial zehnfach, für jeweils 3 h, bei Standardbedingungen (Tabelle 14) extrahiert und die Zusammensetzung untersucht.

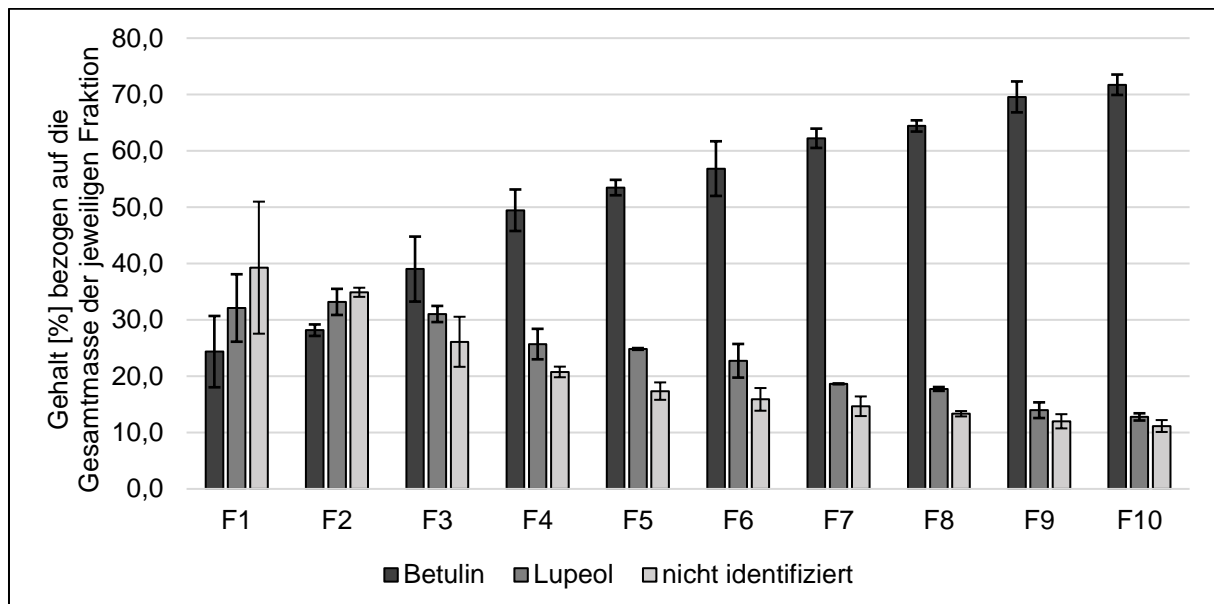


Abbildung 22: Verlauf des Anteils der Hauptbestandteile von Triterpentrockenextrakt bei fraktionierter Extraktion (F1-F10) desselben Materials mit überkritischem CO<sub>2</sub> (MW ± R; n=2)

In Abbildung 22 ist der Verlauf der Konzentration von Betulin und Lupeol sowie der unbekanntes Substanzen über die zehn Fraktionen dargestellt. Wie bereits unter 3.2.2

beschrieben, weist die erste Fraktion einen geringen Anteil an Betulin, bei gleichzeitig erhöhtem Lupeolgehalt, auf. Mit fortschreitender Extraktion nimmt der Gehalt an Betulin immer weiter zu, bis Werte von über 70 % in Fraktion 10 erreicht werden. Die Anteile an Lupeol und sonstigen Substanzen verhalten sich dem gegenläufig. Von über 30 % in Fraktion 1 sinken die Anteile auf knapp über 10 % in Fraktion 10 ab. Zu Beginn der Extraktion wird Lupeol wegen seiner besseren Löslichkeit, aufgrund höherer Lipophilie, bevorzugt extrahiert. Im weiteren Verlauf stellt sich eine langsame Erschöpfung des leicht extrahierbaren Anteils an Lupeol ein. Auf dieses Thema wird unter 3.2.3.1 näher eingegangen. Je weniger Lupeol bzw. unbekannte Substanzen extrahiert werden, desto größer wird der relative Anteil an Betulin im Extrakt. Für Betulin sinken die absoluten Ausbeuten über die zehn Fraktionen langsam ab (s. 3.2.3.1). Die fraktionierte Extraktion bei geringem Massenfluss ist somit eine geeignete Methode, um gezielt Extrakte mit bestimmter Lupeol- und Betulinkonzentration herzustellen.

### **3.2.3.1 Verlauf der absoluten Ausbeute für Lupeol und Betulin bei fraktionierter Extraktion**

Bei fraktionierter Extraktion im Standardverfahren (50 g Birkenkork) mit klassischer Partikelabscheidung sinkt die Lupeolausbeute von ~410 mg nach der ersten Fraktion drastisch ab und die folgenden Fraktionen liefern nur noch Ausbeuten von unter 30 mg Lupeol. Rechnet man diesen leicht extrahierbaren Anteil der ersten Fraktion auf eine Ausgangsmasse im RESS-Verfahren von 200 g Birkenkork hoch, so sollten hier ca. 1640 mg Lupeol einfach zu extrahieren sein. In Abbildung 23 ist der Verlauf der aufsummierten Ausbeute an Lupeol über zehn Fraktionen im RESS-Verfahren dargestellt. Die Werte nähern sich gegen Ende der Kurve einer Gesamtausbeute an Lupeol von ca. 1500 mg an. Die Gesamtausbeute entspricht somit nahezu dem bei der klassischen Methode erreichten Wert für den leicht extrahierbaren Anteil Lupeol. Erst in Fraktion 10 sinkt die Ausbeute an Lupeol unter 30 mg, sodass davon ausgegangen werden kann, dass hier eine weitgehende Erschöpfung erreicht ist. Im Gegensatz dazu folgt die Betulinextraktion, über zehn Fraktionen, einem linearen Trend. Dabei sinkt die Ausbeute von ~440 mg in Fraktion 1 auf ~170 mg in Fraktion 10.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

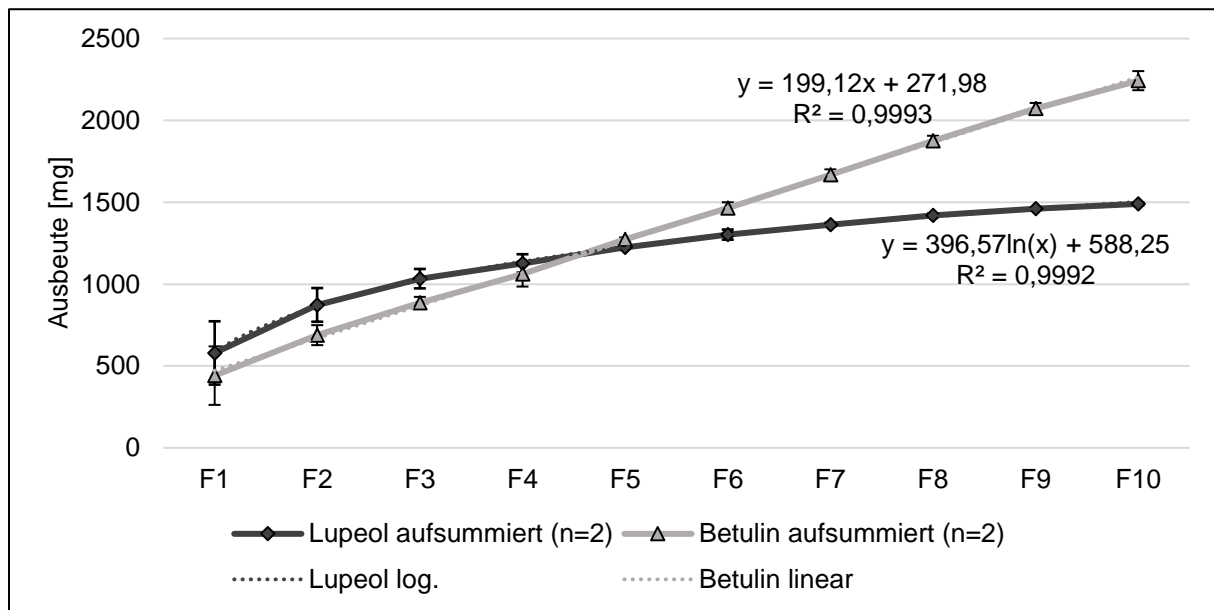


Abbildung 23: Verlauf der aufsummierten Extraktionsausbeute im RESS-Verfahren über zehn Fraktionen (F) für Betulin und Lupeol ( $MW \pm R$ )

#### 3.2.4 Zusammenfassung der Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten aus überkritischer Fluidextraktion

Die in Tabelle 15 aufgeführten Triterpene, als Inhaltsstoffe eines Lösemittelextraktes aus Birkenrinde, finden sich auch in sämtlichen überkritischen Fluidextrakten wieder. Allerdings hat die Extraktionsmethode einen großen Einfluss auf die Zusammensetzung von Triterpentrockenextrakten bezüglich ihrer Hauptbestandteile Betulin und Lupeol. Im RESS-Verfahren hergestellte Extrakte der ersten Fraktion unterscheiden sich durch ihren deutlich geringeren Betulingehalt von Extrakten aus der Lösemittelextraktion und der klassischen SCF-Extraktion. Bei beiden Methoden der überkritischen Fluidextraktion weisen die Extrakte einen erhöhten Lupeolanteil auf. Ebenfalls erhöht ist der Anteil an nicht identifizierten Substanzen bei beiden SCF-Verfahren. Durch eine Veränderung der Extraktionsparameter Druck, Temperatur und Massenfluss kann gezielt Einfluss auf das Betulin-Lupeol Verhältnis im Extrakt genommen werden. Ein weiteres Werkzeug zur Steuerung der Triterpenzusammensetzung im Extrakt ist die fraktionierte Extraktion desselben Ausgangsmaterials. Überkritische Fluidtechnologie bietet also mehrere Möglichkeiten, Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte zu nehmen und es können gezielt Extrakte mit den gewünschten Eigenschaften hergestellt werden.

### **3.3 Stabilisierung halbfester Zubereitungen mit Triterpen-trockenextrakt aus Birkenrinde, gewonnen mit überkritischer Fluidtechnologie**

Für die Nutzung von Triterpentrockenextrakten als Wirk- und Hilfsstoff in Cremes und Gelen, ist die rheologische Charakterisierung dieser halbfesten Zubereitungen essentiell. Kenntnisse über das rheologische Verhalten ermöglichen es, Produkte zu entwickeln, welche die gewünschten Eigenschaften zur Anwendung am Patienten aufweisen. Deshalb soll neben dem Vergleich verschiedener Extraktionsmethoden und deren Einfluss auf das Gelstabilisierungsvermögen der Extrakte, das Verhalten der Extrakte bei längerer Lagerung hinsichtlich der Gelbildung getestet werden. Da sich die Gelstärke über die (Lager-) Zeit der Gele verändern kann [2], wird das Gelbildungsverhalten von Extrakten aus unterschiedlicher Herstellungsmethodik sowohl innerhalb der ersten Stunden nach Herstellung der Gele als auch über einen längeren Lagerzeitraum untersucht. Die Gelstärke kann unter anderem vom Extraktgehalt in der Zubereitung abhängen [2]. Daher werden mit Extrakten aus überkritischer Fluidextraktion Versuche zur Bestimmung der minimalen, für die Gelbildung erforderlichen, Extraktkonzentration durchgeführt und mit den Ergebnissen für Lösemittelextrakte verglichen. Um den Einfluss der Schergeschwindigkeit bei der Gelherstellung auf das Produkt zu untersuchen, werden Gele sowohl nach der Standardmethode mit Hilfe eines Ultra Turrax als auch durch manuelles Mischen mit einem Spatel hergestellt und rheologischen Messungen unterzogen. Sofern nicht anders angegeben, handelt es sich um Gele, die mit 6 % (m/m) Extrakt stabilisiert sind, da diese Konzentration bereits in vorangegangenen Arbeiten erfolgreich eingesetzt wurde [2]. Darüber hinaus werden Cremes mit unterschiedlichem Wassergehalt aus Lösemittelextrakten und überkritischen Fluidextrakten hergestellt, rheologisch vermessen und verglichen. In diesem Abschnitt wird auch die direkte Gelherstellung im RESS-Verfahren vorgestellt. Abschließend wird der Zusammenhang zwischen verschiedenen Extraktparametern und dem Gelbildungsmechanismus diskutiert.

#### **3.3.1 Rheologische Charakterisierung von Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakten aus unterschiedlicher Extraktionsmethodik**

Im Folgenden werden Extrakte aus klassischer überkritischer Extraktion mit RESS-Extrakten und Lösemittelextrakten verglichen. Da diese Lösemittelextrakt während der

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Lagerung größere Agglomerate bilden, werden sie vor Gebrauch gesiebt (315  $\mu\text{m}$  Maschenweite). Der im Vorratsgefäß enthaltene Feinanteil (TE roh) wird ebenfalls getestet, um den Einfluss des Siebens auf die Gelbildung zu untersuchen. Sämtliche Gele werden einem Amplitudensweep (AS) und einem Intervall-Thixotropie-Test (ITT) unterzogen.

#### 3.3.1.1 Gelanalyse mit Hilfe des Amplitudensweeps zum Vergleich des Stabilisierungsvermögens verschiedener Extrakte

Wie in Abbildung 24 zu erkennen ist, zeigen sowohl Extrakte aus überkritischer Fluidextraktion (SCFE und RESS-E) als auch ein Lösemittelextrakt (TE und TE roh) einen für ein Gel typischen Graphen bei Durchführung eines Amplitudensweeps. Bei sämtlichen Proben verlaufen im linear visko-elastischen Bereich (LVE), also im vorderen Abschnitt des Diagramms, die Speichermodulwerte auf einem höheren Niveau, verglichen mit dem dazugehörigen Verlustmodul. Nach dem sogenannten Cross-Over im mittleren Teil des Diagramms dominiert bei allen Proben das viskose Verhalten, was auf einen Abbau der inneren Struktur hinweist. Dieser Kurvenverlauf ist beispielhaft für halbfeste Zubereitungen mit pseudoplastischem Fließverhalten.

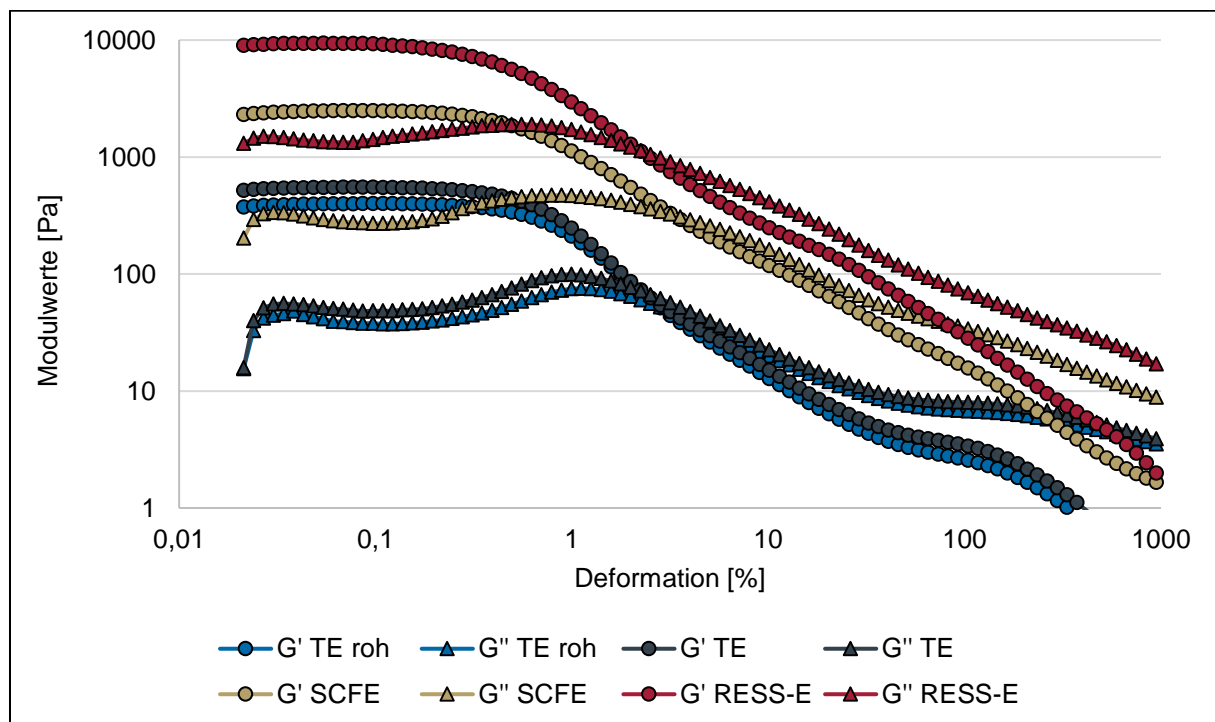


Abbildung 24: Amplitudensweep von Gelen stabilisiert mit Lösemittelextrakt (TE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt (repräsentative Kurven für die jeweilige Extraktart)



Der leicht nach oben verschobene Kurvenverlauf von TE zu TE roh deutet darauf hin, dass die Desagglomeration der Partikel beim Sieben einen leicht ausgeprägten, positiven Effekt auf die Gelbildung hat. Aus den Diagramm Daten berechnete Gelstärken belegen wesentlich höhere Werte für die Zubereitungen, die mit überkritischem Fluidextrakt stabilisiert sind. Mit Gelstärken von 9142 Pa für den ausgewählten RESS-Extrakt und 2442 Pa für den überkritischen Fluidextrakt, weisen diese Gele eine deutlich höhere Viskosität verglichen mit den OSE-Gelen (TE: 543 Pa; TE roh: 394 Pa) auf. Dies zeigt, dass Triterpentrockenextrakte aus überkritischer Fluidextraktion gut geeignet sind, um als Gelbildner in Oleogelen zu fungieren. Um das Gelbildungsverhalten der verschiedenen Extraktarten weiter zu analysieren, werden die Gelstärken von umfangreicheren Versuchsreihen verglichen (Abbildung 25).

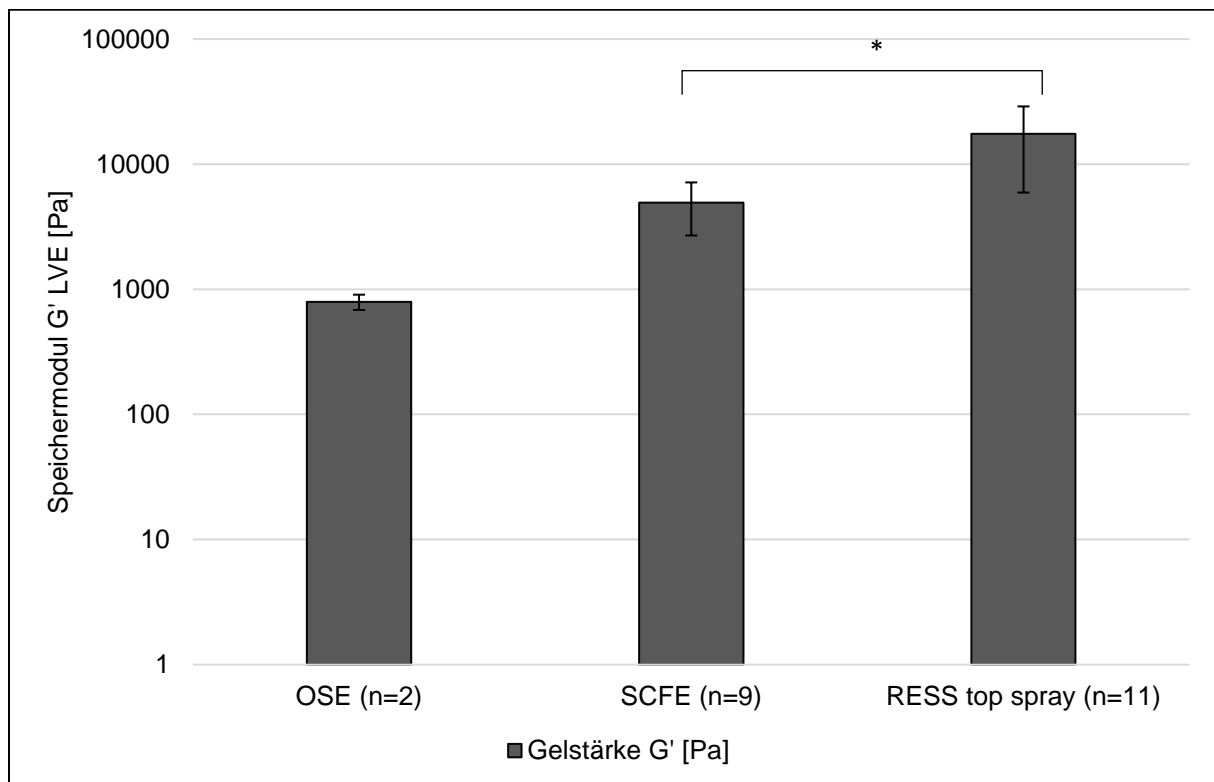


Abbildung 25: Vergleich der Gelstärke von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (OSE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt ( $MW \pm SD$ ;  $MW \pm R$ )

Aus zwei Lösemittel-extrakten werden acht bzw. drei Gele hergestellt, vermessen und der Mittelwert der Gelstärke gebildet. Bei den neun Chargen SCFE und elf Chargen RESS-Extrakt werden je 3 Gele produziert und die Messwerte gemittelt. Extrakte aus Lösemittel-extraktion, überkritischer Fluidextraktion und RESS-Extraktion unterscheiden sich deutlich in ihrem Gelbildungsvermögen. Der Strukturaufbau innerhalb des Gels mithilfe der Extrakt-partikel resultiert beim OSE-Gel in einer

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Gelstärke von knapp 800 Pa. Die Stabilisierung mit Extrakten aus überkritischer Fluid Technologie ermöglicht bei gleicher Feststoffkonzentration deutlich höhere Gelstärken von fast 5000 Pa (SCFE) und über 17000 Pa, bei Einsatz von RESS-Extrakten. Die zugrundeliegenden Mechanismen werden unter 3.3.8 diskutiert.

Eine Betrachtung des Gelcharakters, also des Verlustfaktors im LVE-Bereich (Abbildung 26), macht deutlich, dass für alle Extraktarten (bzw. deren Gele) der Grenzwert von eins deutlich unterschritten wird. Dies bestätigt eine ausgeprägte Gelcharakteristik und zeigt, dass die Dominanz des elastischen Anteils über das viskose Verhalten weitgehend unabhängig von der Produktionsmethode der Extrakte ist.

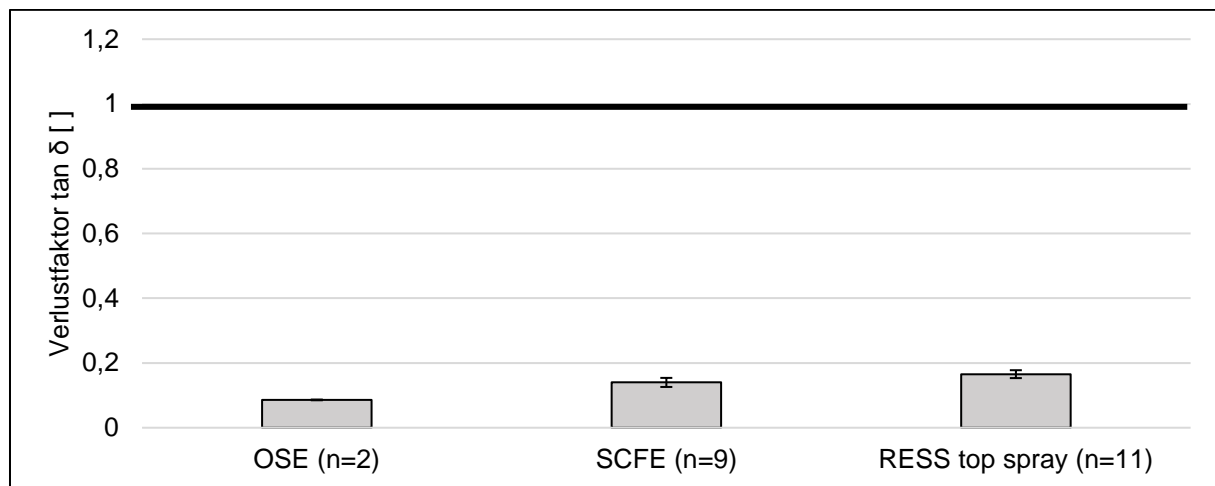


Abbildung 26: Verlustfaktor von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (OSE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt ( $MW \pm SD$ ;  $MW \pm R$ )

#### 3.3.1.2 Thixotropieanalyse von Gelen stabilisiert mit Extrakten aus unterschiedlichen Herstellungsverfahren

Um das thixotrope Verhalten von Gelen, die mit Lösemittel-extrakt, überkritischem Fluidextrakt und RESS-Extrakt hergestellt werden, zu untersuchen, kommt der Drei Intervall Thixotropie Test zur Anwendung. An den Beispielen in Abbildung 27 ist zu erkennen, dass es für alle Extraktarten nach dem ersten Intervall mit moderater Scherrate und daraus resultierenden konstanten Modulwerten zu einem Crossover von Speicher- und Verlustmodul kommt. Somit findet ein Gel-Sol Übergang, bedingt durch die höhere Scherrate im zweiten Intervall, statt. Ein Wiederaufbau der Gelstruktur im dritten Abschnitt unter erneuter, moderater Scherung findet für alle

Gelarten statt. Es ist also sowohl für Gele stabilisiert mit TE, als auch für die Gele mit überkritisch hergestellten Extrakten thixotropes Verhalten zu erwarten.

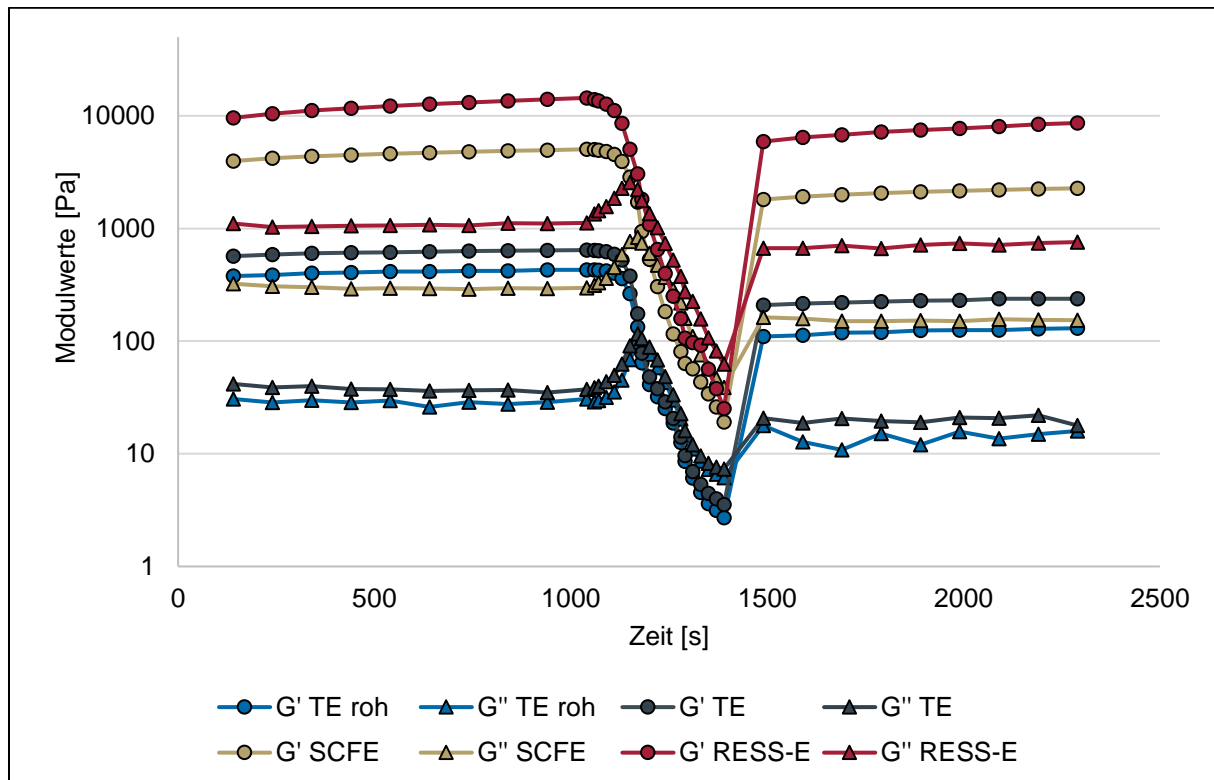


Abbildung 27: Intervall-Thixotropie-Test von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (TE), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt (repräsentative Kurven für die jeweilige Extraktart)

Als Maß für die Thixotropie wird die prozentuale Wiederherstellung der Gelstärke ( $G'$ ) im dritten Intervall der Prüfung herangezogen. Diese Rückbildung der Gelstruktur ist bei TE-Gelen und SCFE-Gelen mit ca. 50 % ähnlich stark ausgeprägt (Abbildung 28). Hier wird deutlich, warum das Sieben des TE-Rohextraktes notwendig ist, da die Wiederherstellung der Gelstärke ohne Desagglomeration bei lediglich ~30 % liegt. Die Lagerung der Extrakte über mehrere Jahre kann also die Fähigkeiten zur Gelbildung negativ beeinflussen, wenn es bei der Lagerung zu Agglomeration der Extraktpartikel kommt. Daher werden unter 3.3.2 Versuche zur Langzeitlagerung und anschließender Gelherstellung von SCF-Extrakten beschrieben. Bei den Gelen, die mit RESS-Extrakt stabilisiert sind, liegt die Wiederherstellung mit ~65 % über den anderen Werten. Das thixotrope Verhalten von RESS-Extrakten ist demnach, verglichen mit Lösemittel-extrakten und SCF-Extrakten, etwas stärker ausgeprägt. Auffällig sind die größeren Standardabweichungen beim Einsatz von überkritisch hergestellten Extrakten. Eine mögliche Begründung ist hier im manuell gesteuerten

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Abscheideprozess zu suchen, der Einfluss auf die Eigenschaften der Extrakte haben kann.

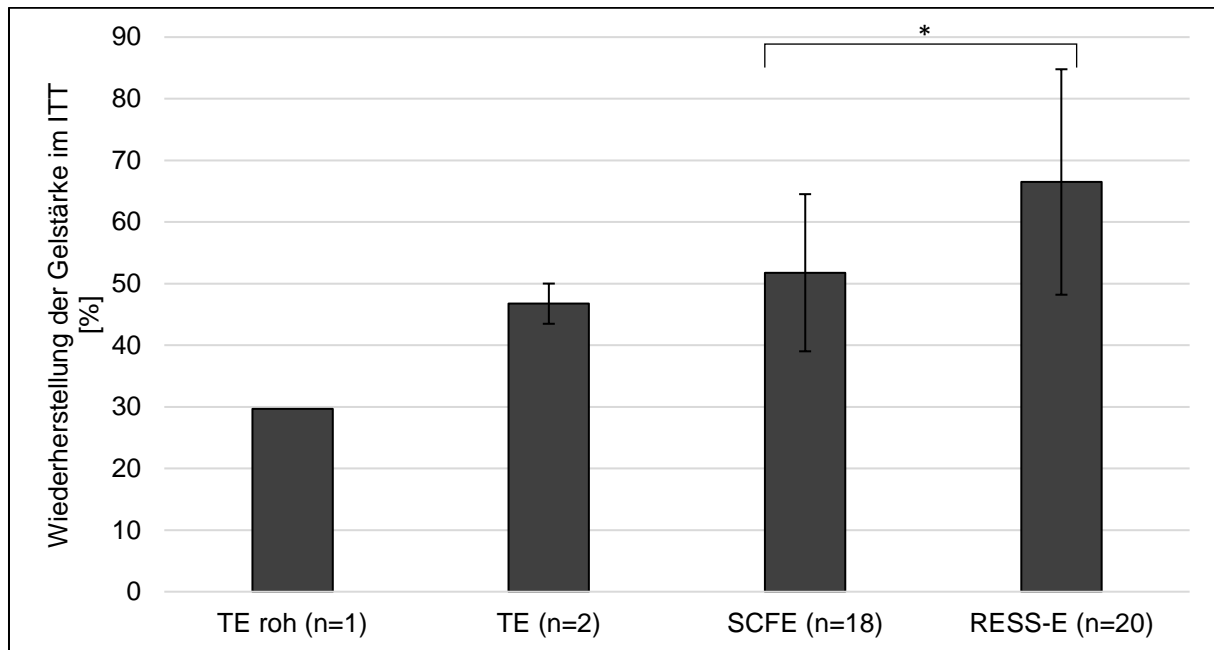


Abbildung 28: Verhalten im Intervall Thixotropie Test (ITT) von Gelen stabilisiert mit Lösemittlextrakt (TE und TE roh), überkritischem Fluidextrakt (SCFE) und RESS-Extrakt ( $MW \pm SD$ ;  $MW \pm R$ )

#### 3.3.2 Einfluss der Lagerdauer der Extrakte auf die Gelbildung

Da Birkenkorkextrakt aus Lösemittlextraktion nach längerer Lagerzeit zu starker Agglomeration neigt, und dies einen Einfluss auf die Fähigkeit zur Stabilisierung von Gelen haben kann, wird mit Extrakten aus überkritischer Fluidtechnologie eine Versuchsreihe zur Lagerung und anschließender Gelbildung über ein Jahr durchgeführt. Es soll untersucht werden, ob die Lagerung des Extraktes die Gelstärke beeinflusst. Dazu wird direkt nach der Extraktion von Birkenkork mit überkritischem  $CO_2$  ein Gel aus dem produzierten Extrakt hergestellt und nach 24 h rheologisch vermessen. Aus diesem Extrakt wird nach jeweils drei Monaten ein weiteres Gel hergestellt und dieses nach 24 h vermessen. Bei optischer Betrachtung des Extraktes fällt über den Analysenzeitraum keine Veränderung durch Agglomeration auf. Die in Abbildung 29 dargestellte Gelstärke über ein Jahr weist zwar leichte Schwankungen auf, liegt aber auf gleichbleibendem Niveau von  $2079 \pm 488$  Pa.

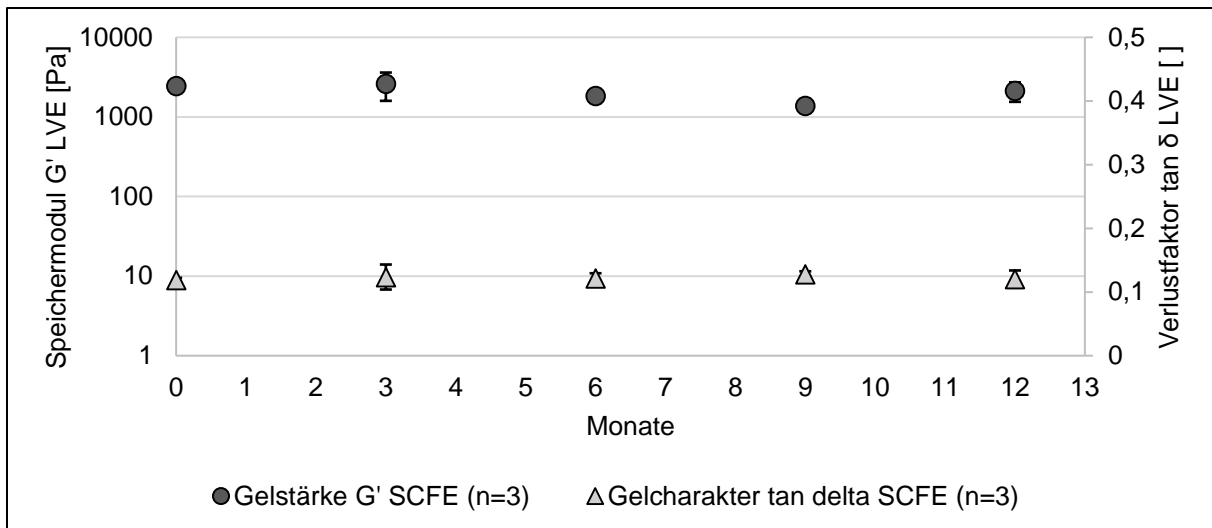


Abbildung 29: Verhalten von überkritischen Fluidextrakten (SCFE) hinsichtlich Gelbildung bei Lagerung der Extrakte über ein Jahr

Der Verlustfaktor, und damit der Gelcharakter, bleibt mit  $0,122 \pm 0,003$  über ein Jahr konstant. Über den getesteten Zeitraum findet also keine nennenswerte Veränderung des Extraktes hinsichtlich der Fähigkeit zur Gelstabilisierung statt. Der Zeitpunkt für die rheologische Charakterisierung kann also innerhalb eines Jahres frei gewählt werden.

### 3.3.3 Strukturaufbau und -veränderung über die Zeit bei Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakt

In ihrer Dissertation hat Grysko 2011 [2] Versuche zur Gelstärke über einen Zeitraum von zwei Wochen mit Gelen beschrieben, die mit Lösemittelextrakt aus Birkenrinde verfestigt wurden. Im Verlauf der zwei Wochen kommt es zu einem Anstieg der Gelstärke durch den zeitabhängigen Aufbau der Gelstruktur. Dieser Strukturaufbau soll im Folgenden sowohl während der ersten sechs Stunden nach Gelherstellung als auch über einen längeren Lagerzeitraum (vier Monate) analysiert werden. Zur Untersuchung des frühen Abschnitts der Gelbildung wird eine größere Menge an Gel produziert. Innerhalb der ersten sechs Stunden wird jede halbe Stunde eine Gel-Probe entnommen und ein Amplitudensweep durchgeführt. Ein Vergleich zwischen einem LM-Extrakt und einem SCF-Extrakt soll zeigen, ob sich die Unterschiede in der Gelstärke zwischen den beiden Extraktionsverfahren sofort nach der Herstellung oder erst über die Zeit ergeben. Beim Langzeittest mit Probenzug nach 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 8 d, 15 d, 22 d, 29 d, 8 w und 16 w, wird das Verhalten der Gelstruktur von LM-

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Extrakt Gelen und SCF-Extrakt Gelen über einen Zeitraum längerer Lagerung untersucht.

#### 3.3.3.1 Gelbildungsgeschwindigkeit während der ersten sechs Stunden

In Abbildung 30 ist der Verlauf der Gelstärke über die Zeit dargestellt. Die anfängliche Gelstärke beim LM-Extrakt Gel beträgt 17 Pa, entsprechend 2,4 % des 24 h Referenzgels für Lösemittlextrakte. Das SCF-Extrakt Gel startet bereits auf einem relativ hohen Niveau von 3062 Pa, was 27,6 % der dazugehörigen Referenz entspricht. Direkt nach der Gelherstellung ist der Extrakt aus überkritischer Fluid Technologie in der Lage sofort ein Gel mit relativ hoher Gelstärke hervorzubringen. Die höhere Viskosität der SCF-Extrakt Gele ist sowohl durch Schwenken der Herstellungsgefäße als auch an den Messdaten zu erkennen. Bei beiden Gel Arten findet im Laufe der ersten sechs Stunden eine nahezu lineare Zunahme der Gelstärke statt.

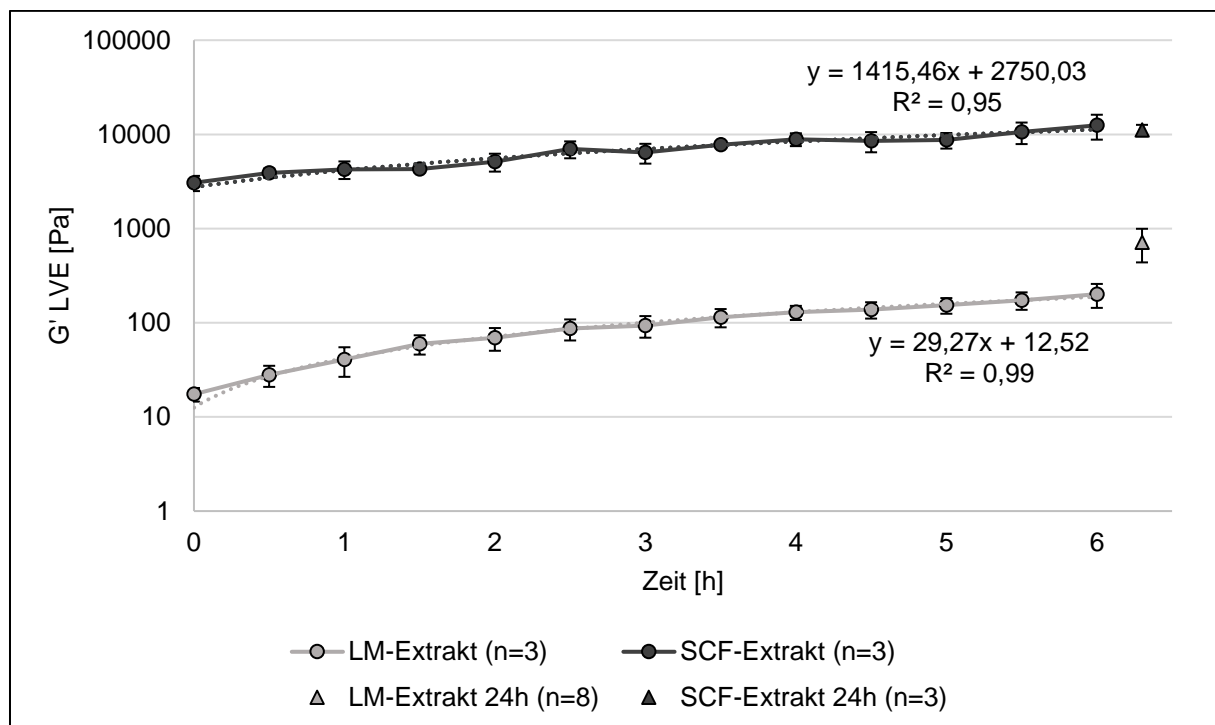


Abbildung 30: Verhalten von Gelen stabilisiert mit Lösemittlextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) während der ersten sechs Stunden nach Herstellung ( $MW \pm SD$ )

Dabei erreicht das SCF-Extrakt Gel das Niveau der 24 h Referenzmessung bereits nach ca. 5,5 Stunden. Innerhalb des vermessenen Zeitraums erreicht das LM-Extrakt Gel lediglich ~28 % seines 24 h Referenzwertes. Die Gelbildung verläuft beim Gel,

stabilisiert mit überkritischem Fluidextrakt, also deutlich schneller ab. Der SCF-Extrakt ist somit in der Lage, das innere Netzwerk der Zubereitung effektiver aufzubauen.

Ein Blick auf den Gelcharakter über diesen Zeitraum macht deutlich, dass das LM-Extrakt Gel auch hier Zeit benötigt, um den Gelcharakter auszubilden (Abbildung 31). Der Verlustfaktor von  $0,38 \pm 0,04$  ( $n=3$ ) direkt nach der Gelherstellung zeigt, dass von Beginn an Gelstruktur vorliegt. Über die Zeit gehen Speicher- und Verlustmodul weiter auseinander, was kleinere Werte für den Verlustfaktor nach sich zieht. Während der ersten sechs Stunden entwickelt sich das elastische Verhalten des Gels also zulasten des viskosen Verhaltens. Auch hier wird der 24 h Referenzwert im vorgegebenen Zeitraum nicht erreicht. Anders sieht der Kurvenverlauf für den Gelcharakter beim SCF-Extrakt Gel aus. Sofort nach der Herstellung des Gels ist die Diskrepanz zwischen Speicher- und Verlustmodul voll ausgeprägt ( $\tan\delta = 0,12$ ) und weist innerhalb von sechs Stunden einen leichten Anstieg auf 0,15 auf.

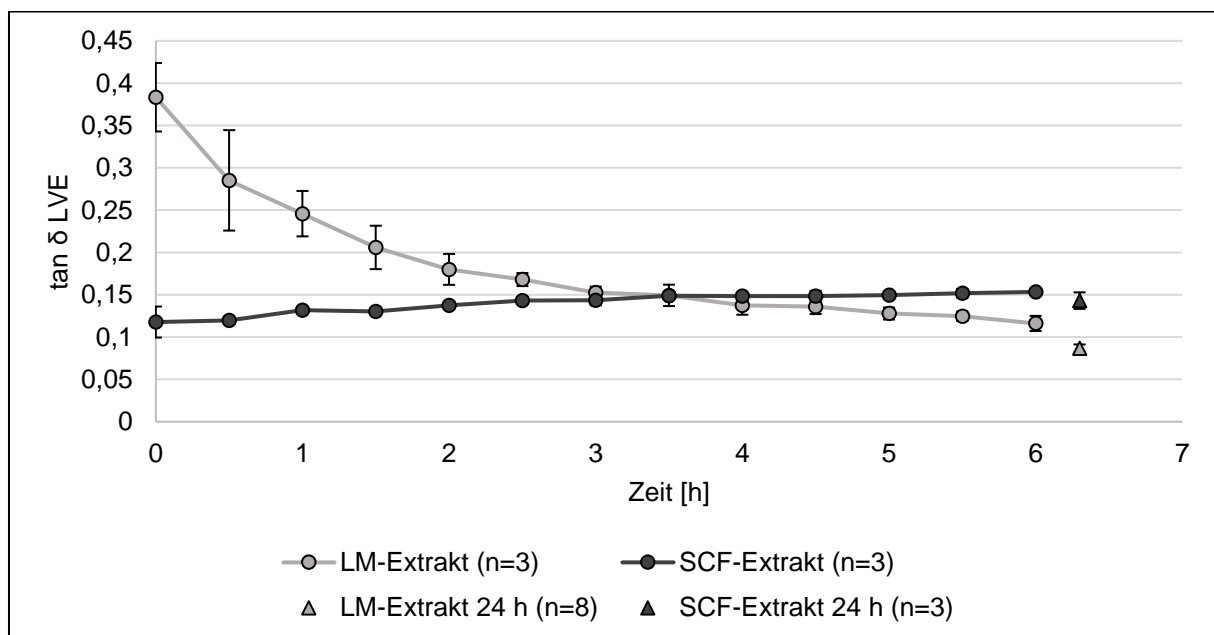


Abbildung 31: Verlustfaktor von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) während der ersten sechs Stunden nach Herstellung ( $MW \pm SD$ )

Im Vergleich mit einem Gel das Lösemittel-extrakt enthält, wird für die Ausprägung des Gelcharakters beim SCF-Extrakt Gel weniger Zeit benötigt. Mögliche Gründe hierfür werden unter 3.3.8 diskutiert.

#### 3.3.3.2 Entwicklung von Gelstärke und Gelcharakter bei Lagerung von Gelen stabilisiert mit Lösemittlextrakt und überkritischem Fluidextrakt

Der Langzeitversuch zur Lagerung der Gele, die mit LM-Extrakt und SCF-Extrakt stabilisiert sind, wird über 16 Wochen durchgeführt. Die Entwicklung der Gelstärke über diesen Zeitraum ist in Abbildung 32 dargestellt. Es soll untersucht werden, wann die Gelbildung vollständig abgeschlossen ist bzw. wann sich ein Gleichgewicht zwischen Strukturaufbau und Strukturabbau eingestellt hat. Wie von Grysko beschrieben [2], steigt die Gelstärke für das LM-Extrakt stabilisierte Gel während der ersten zwei Wochen noch deutlich an. Anschließend bildet sich eine Plateauphase aus, während der die Gelstärke nur noch langsam ansteigt, bzw. nach ca. zwei Monaten einen konstanten Wert erreicht. Beim SCF-Extrakt Gel wird dieses Plateau bereits nach ca. acht Tagen erreicht. Die volle Ausbildung der Gelstärke bei Lagerung über mehrere Monate ist bei Birkenkorkextrakten aus überkritischer Fluidtechnologie früher abgeschlossen und unterstreicht die Ergebnisse zur schnelleren und effektiveren Gelbildung (3.3.1.1; 3.3.3.1), verglichen mit Gelen, die Lösemittlextrakt enthalten.

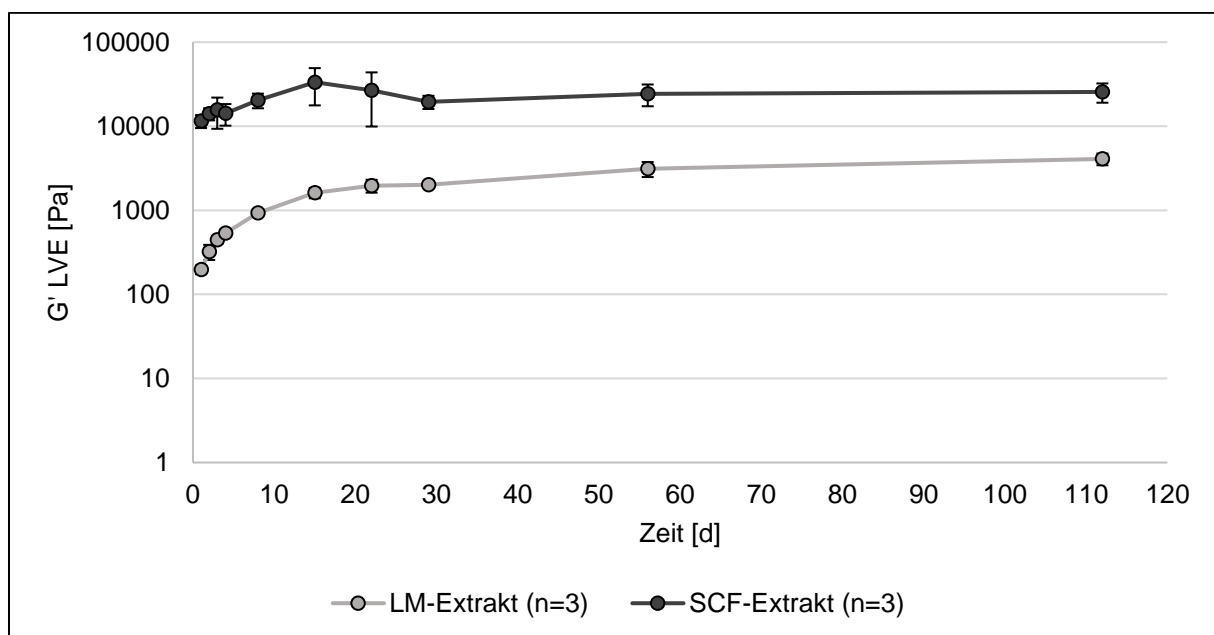


Abbildung 32: Gelstärke bei Lagerung von Gelen stabilisiert mit Lösemittlextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ )

Ein ähnliches Bild zeigt sich bei Betrachtung der Entwicklung des Gelcharakters über die Lagerdauer (Abbildung 33). Abgesehen von leichten Schwankungen bei den Ergebnissen für das SCF-Extrakt Gel, bleibt der Wert über die gesamte Lagerdauer konstant. Verglichen mit der Gelstärke, geht die Einstellung des Verlustfaktors auf



konstante Werte für das LM-Extrakt Gel etwas schneller. Nach ca. drei Tagen wird hier ein Plateau erreicht und nicht mehr verlassen.

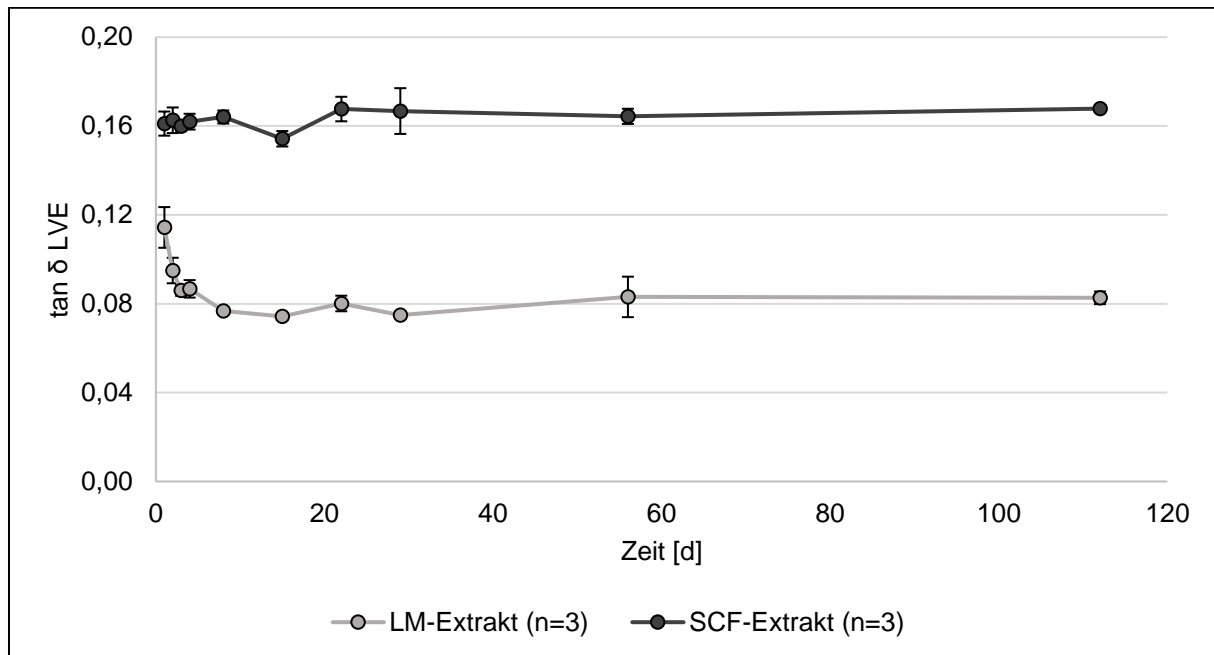


Abbildung 33: Gelcharakter bei Lagerung von Gelen stabilisiert mit Lösemittel-extrakt (LM) und überkritischer Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ )

### 3.3.4 Einfluss der Extrakt Konzentration auf die Gelbildung

Als Standardkonzentration für die Herstellung von triterpenhaltigen Gelen hat sich ein Extraktanteil von 6 % (m/m) bewährt. Im Folgenden soll untersucht werden wie weit die Konzentration an Trockenextrakt abgesenkt werden kann, ohne die Gelbildung derart zu beeinträchtigen, dass kein Gel mehr entsteht. Für den verwendeten Lösemittel-extrakt bestehen Daten in der Literatur, die von einer Mindestkonzentration von knapp über 2 % sprechen [2]. Dies wird für den Lösemittel-extrakt überprüft und mit einem Extrakt aus überkritischer Fluidextraktion verglichen. Für beide Extrakte werden Gele mit 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 % und 5 % Extrakt hergestellt und nach 24 h einem Amplitudensweep unterzogen. Nach fünf Monaten Lagerung wird die Messung wiederholt, um die Auswirkungen auf die Gelstärke und den Gelcharakter zu untersuchen.

Wie zu erwarten, steigt die Gelstärke mit zunehmender Konzentration an Extrakt an (Abbildung 34). Je mehr Extraktpartikel für die Ausbildung des inneren Netzwerkes zur Verfügung stehen, desto stabiler verhält sich das Gel bei Scherbelastung.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

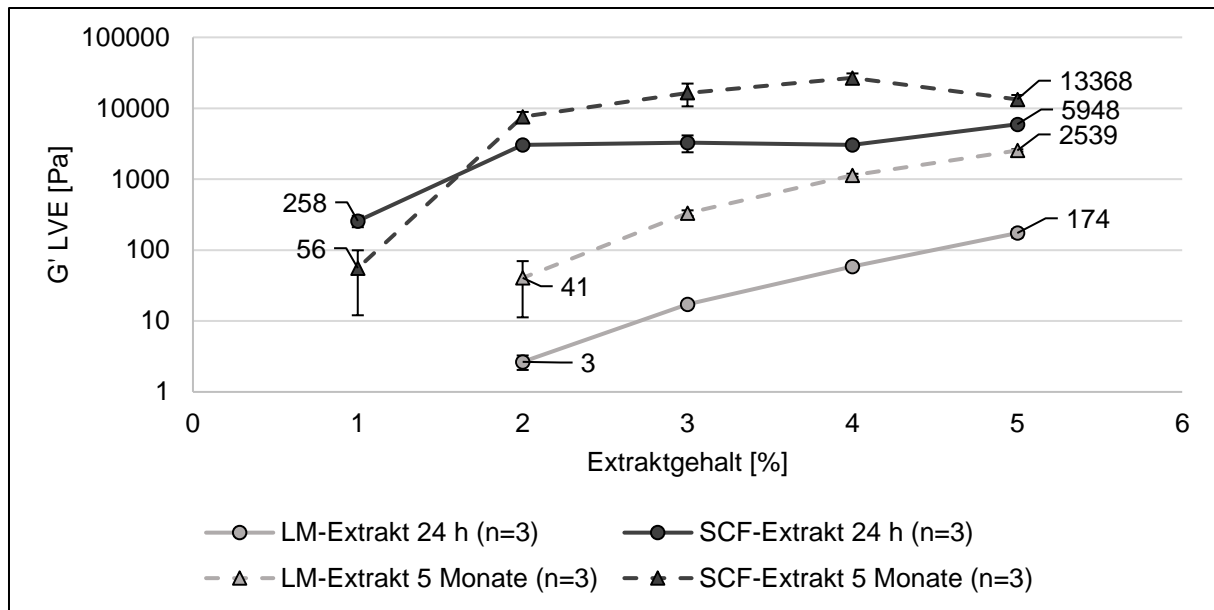


Abbildung 34: Gelstärke in Abhängigkeit vom Extraktgehalt an Lösemittlextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ )

Beim Gel, das mit Lösemittlextrakt hergestellt wird, verläuft die Zunahme der Gelstärke bei der 24 h Messung nahezu linear, während beim SCF-Extrakt Gel ein Plateau zwischen 2 % und 4 % entsteht. Nach 24 h liegt die Gelstärke des 1 %-igen SCF-Extrakt Gels immer noch höher als die des 5 %-igen LM-Extrakt Gels. Um eine ähnliche Gelstärke zu erreichen, ist also beim überkritischen Fluidextrakt deutlich weniger Substanz nötig. Durch die Lagerung über fünf Monate steigen die Gelstärken für beide Gelarten an (Abbildung 34). Lediglich der Wert für das 1 %-ige SCF-Extrakt Gel sinkt ab. Hier ist der Grenzbereich für diese Gelart erreicht. Die Gelstärken im jeweiligen Grenzbereich für beide Gelarten gleichen sich über die Zeit an. Somit weisen das 1 %-ige SCF-Extrakt Gel und das 2 %-ige LM-Extrakt Gel nach der Lagerzeit ähnliche Gelstärken auf. Die Tatsache, dass hier immer noch die halbe Menge an SCF-Extrakt ausreicht, um ein ähnlich stabiles Netzwerk auszubilden, wird unter 3.3.8 diskutiert. Die Herstellung einer halbfesten Zubereitung gelingt in dieser Versuchsreihe für den Lösemittlextrakt bis zu einer minimalen Konzentration von 2 %. Dies stellt die Grenzkonzentration des Lösemittlextraktes dar. Bei der Messung nach 24 h liegt der Verlustfaktor für das 2 % LM-Extrakt Gel über dem Grenzwert für den Gelcharakter ( $\tan \delta > 1$ ) (Abbildung 35).

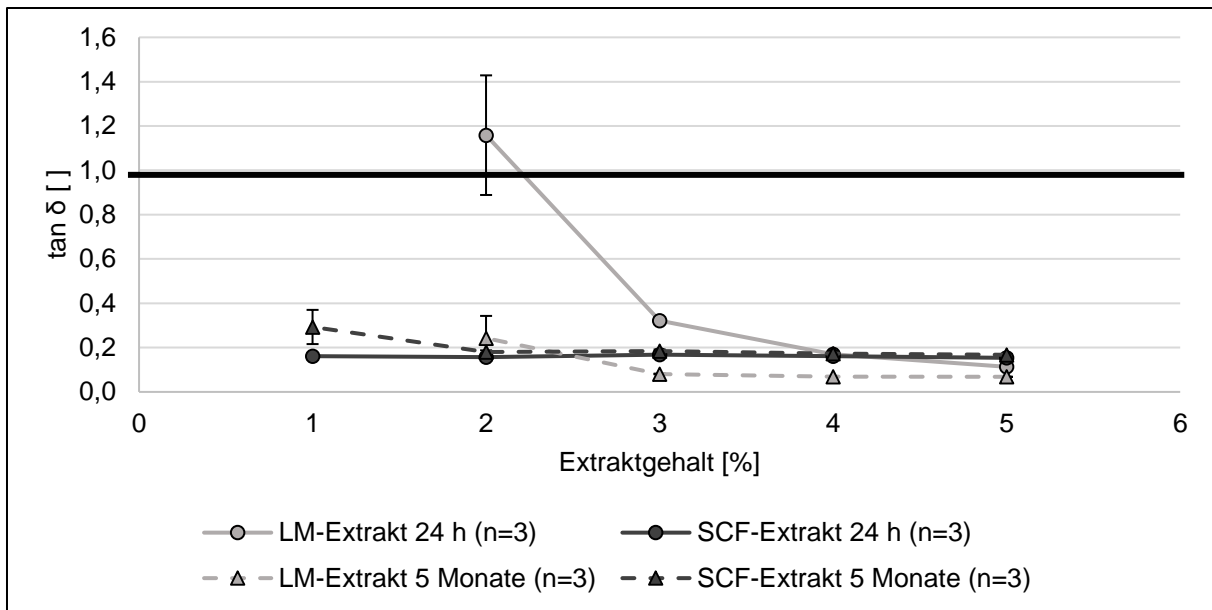


Abbildung 35: Gelcharakter in Abhängigkeit vom Extraktgehalt an Lösemittlextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ )

Während der Lagerung stabilisiert sich die innere Struktur und nach fünf Monaten ist auch für diese Probe ein Verlustfaktor im Bereich für Gele messbar. Für noch kleinere Konzentrationen ist auch nach mehrtägiger Lagerung keine Gelstruktur nachzuweisen. Optisch ist bei diesen Proben eine Separation von Öl und Extrakt durch Sedimentation zu erkennen (Abbildung 36).

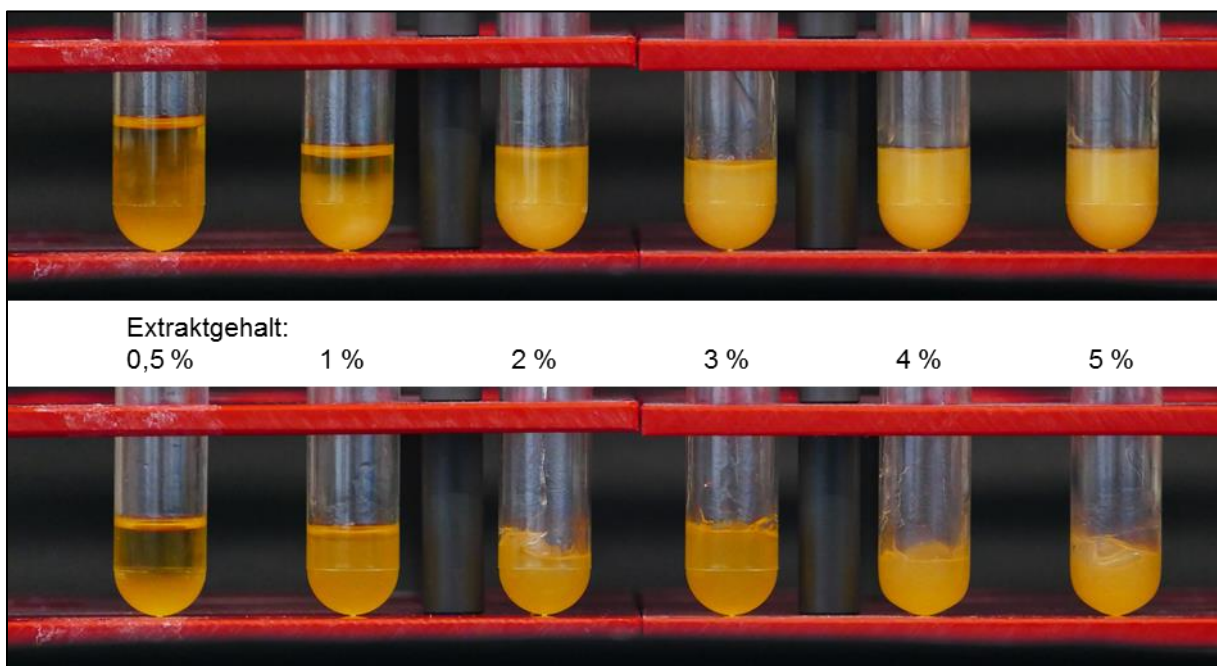


Abbildung 36: Gele mit unterschiedlichem Gehalt an Triterpenextrakt aus Lösemittlextraktion (oben) und überkritischer Fluidextraktion (unten)

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Die Herstellung von Gelen unterhalb von 2 % ist somit mit Lösemittlextrakt nicht möglich. Durch die Verwendung von SCF-Extrakt kann die minimale Konzentration zur Gelbildung weiter abgesenkt werden. Die Zubereitung mit 1 % Extrakt weist, sowohl was die Stärke als auch den Charakter angeht, Gel Eigenschaften auf. Der Versuch mit 0,5 % Extrakt eine halb feste Zubereitung herzustellen scheitert auch hier, was unter anderem durch die Trennung von Extrakt und Öl zu erkennen ist (Abbildung 36). Über den gesamten Konzentrationsbereich von 1 % bis 5 % und über die Lagerdauer bleibt beim SCF-Extrakt Gel der Verlustfaktor weitgehend konstant. Die Qualität des Gelnetzwerkes ist also in diesem Bereich unabhängig von der Konzentration.

#### **3.3.5 Manuelle Gelherstellung mit Lösemittlextrakt und überkritischem Fluidextrakt**

Die Gelherstellung durch händisches Einrühren der Extrakte (6 % m/m) in die Grundlage soll zeigen, ob auch ohne massive Scherbelastung eine Desagglomeration der Extraktpartikel und somit der Aufbau einer Gelstruktur ermöglicht werden kann. Nach der Herstellung werden die Zubereitungen 24 h gelagert und anschließend rheologisch vermessen. Ist nach dieser Zeitspanne keine Gelbildung zu beobachten, so wird die Lagerung um weitere 48 h verlängert und die Messung wiederholt. Im Test befinden sich jeweils drei verschiedene Lösemittlextrakte (TE1-TE3) und überkritische Fluidextrakte (E17, E27, E32).

Nach 24 h Lagerung zeigen die Gelproben der Lösemittlextrakte TE1 und TE2 keine Anzeichen von Gelbildung. Auch die verlängerte Standzeit bringt keine Verbesserung der Ergebnisse. Bei beiden Proben ist nach 72 h eine Sedimentation des Extraktes zu beobachten. Das TE3-Gel weist nach 24 h eine leichte Verfestigung auf. Die rheologische Charakterisierung belegt allerdings keine Gelstruktur nach 24 h. Bei wiederholter Vermessung nach 72 h zeigt sich, dass der Strukturaufbau weiter fortgeschritten ist, und Gelcharakter nachgewiesen werden kann. Diese Werte werden mit denen der SCF-Extrakt Gele verglichen. Alle drei SCF-Extrakte sind in der Lage nach 24 h ein stabiles Netzwerk mit Geleigenschaften auszubilden (Abbildung 37). Die Gelstärke aller Proben bleibt, mit ~230 – 1300 Pa für die SCF-Extrakt Gele und 84 Pa für das TE3-Gel, weit hinter den für den jeweiligen Extrakt üblichen Werten zurück.

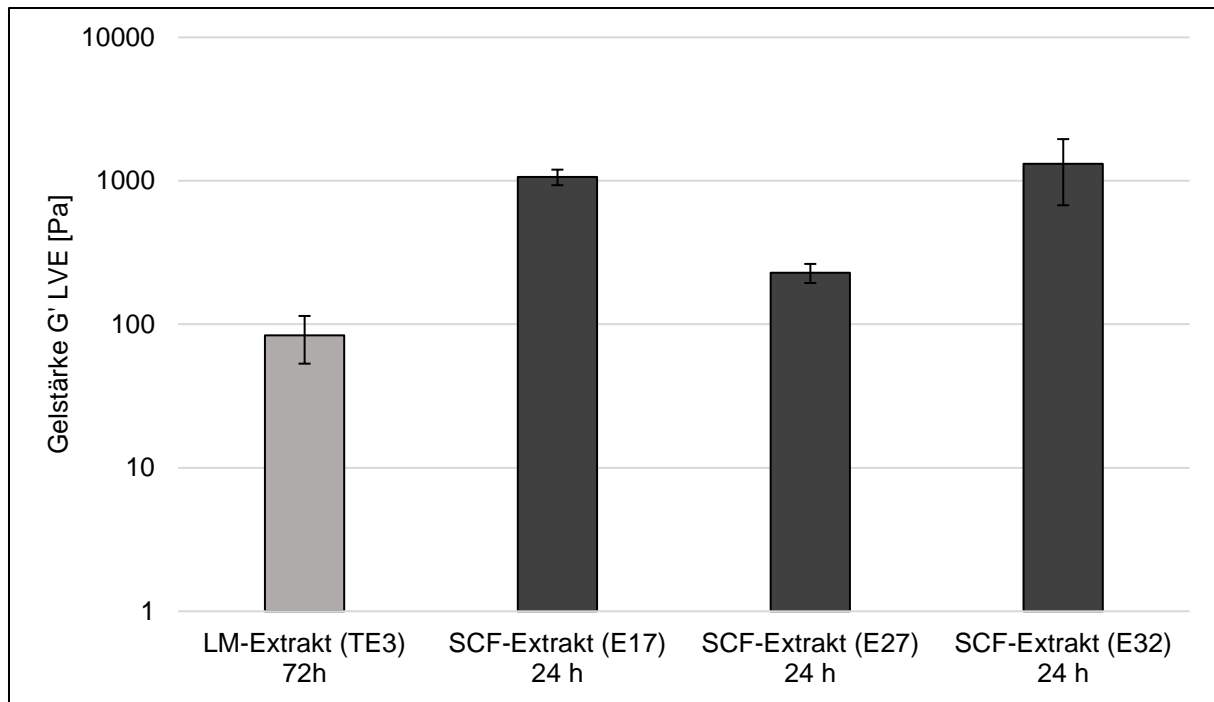


Abbildung 37: Gelstärke bei manueller Gelherstellung mit Lösemittlextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ ;  $n=3$ )

Bei der Gelherstellung sind die auftretenden Scherkräfte somit von entscheidender Bedeutung für die Gelstärke. Die Desagglomeration der Extraktpartikel gelingt bei den untersuchten SCF-Extrakten leichter als bei den Lösemittlextrakten. Eine mögliche Begründung ist in der Oberflächenbeschaffenheit der Extrakte zu suchen (siehe auch 3.3.8.1).

### 3.3.6 Stabilisierung von Cremes mit Lösemittlextrakt und überkritischem Fluidextrakt

Neben dem Einsatz zur Stabilisierung von Gelen soll untersucht werden, ob die produzierten SCF-Extrakte in der Lage sind, als (Pickering-) Emulgator zu fungieren, und somit zur Herstellung von Cremes genutzt werden können. Bei der Cremeherstellung im Ultra Turrax (Direktherstellung und Vorgelierung 2.2.3.1.2) kommt es, vor allem bei hohem Wassergehalt, zu einem massiven Anstieg der Viskosität durch die Reibung der inneren Phase. Dies hat zur Folge, dass die Zubereitung stark am Gefäßrand und am Ultra Turrax haftet und somit die Homogenisierung bzw. Durchmischung nicht gewährleistet ist. Um dieses Problem zu umgehen, wird für diesen Versuchsteil ausschließlich das Spritze-Spritze Verfahren (2.2.3.1.2) angewendet. Ein Lösemittlextrakt wird gegen einen überkritischen

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Fluidextrakt getestet. Mit beiden Extrakten werden Cremes mit unterschiedlichem Wassergehalt hergestellt (Zusammensetzung im Anhang unter 7.3) und nach 24 h einem Thixotropietest unterzogen. Da die Proben mit einem Wassergehalt von über 43 % sowohl bei Verwendung des Lösemittelextraktes als auch beim überkritischen Fluidextrakt bereits nach 24 h sichtbare Wassertröpfchen aufweisen, werden sie nicht in die Auswertung einbezogen. Optisch auszumachende Tröpfchen sprechen für ein partielles Brechen der Creme. Hier ist die Kapazität zur Wasseraufnahme somit erschöpft. Die maximale Wasseraufnahme liegt für beide Extrakte in einem ähnlichen Bereich von knapp über 40 %, bezogen auf die Gesamtmasse der Zubereitung.

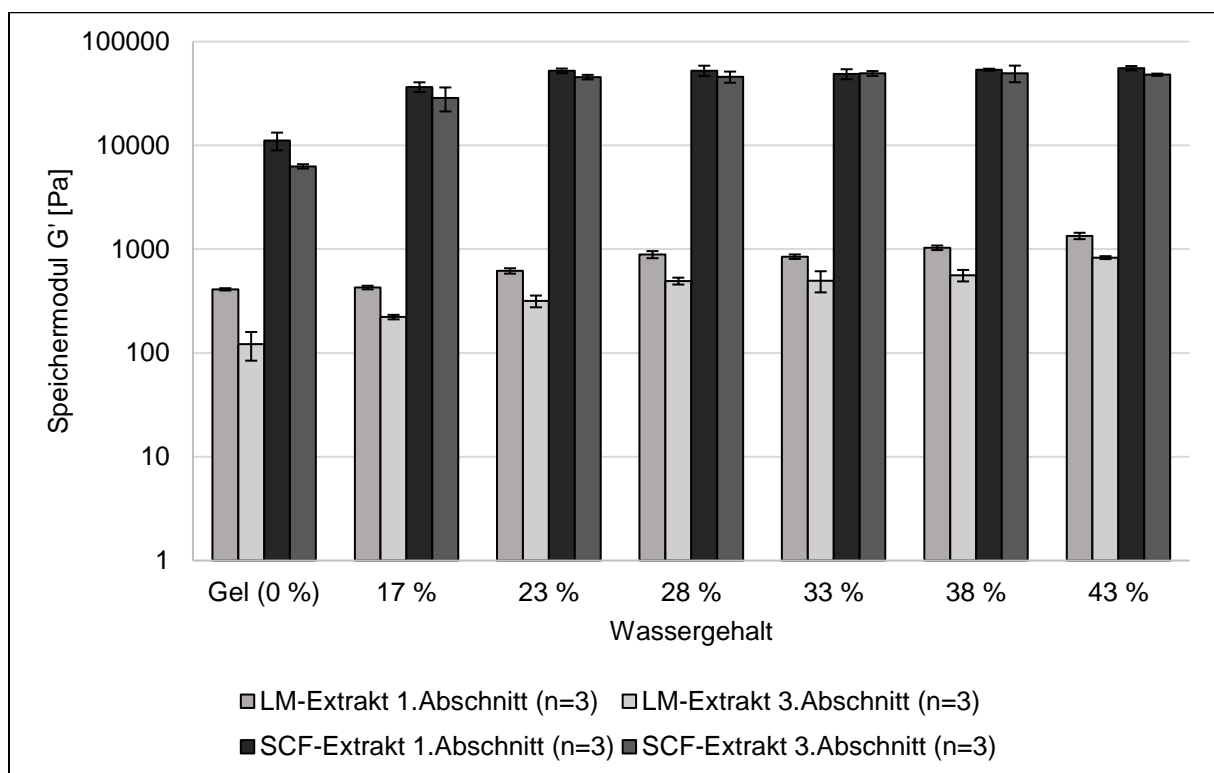


Abbildung 38: Gelstärke und Thixotropie bei Cremes mit unterschiedlichem Wassergehalt stabilisiert mit Lösemittelextrakt (LM) und überkritischem Fluidextrakt (SCF) ( $MW \pm SD$ )

Verglichen mit der wasserfreien Gelzubereitung weisen die wasserhaltigen Cremes eine höhere Viskosität auf, was in höheren Speichermodulwerten resultiert (Abbildung 38). Mit zunehmendem Wassergehalt steigen die Modulwerte bei der LM-Extrakt Creme leicht an. Bei der Zubereitung mit SCF-Extrakt bildet sich ab 23 % Wassergehalt ein Plateau aus. Insgesamt liegen die Speichermodulwerte der SCF-Extrakt Creme auf einem sehr hohen Niveau von über 50000 Pa. Hier scheint ein Maximum an innerer Reibung erreicht zu sein, das auch bei weiterer Wasserzugabe nicht überschritten wird. In ihrem thixotropen Verhalten unterscheiden sich die beiden

Zubereitungsarten signifikant ( $p < 0,01$ ). Die durchschnittliche Wiederherstellung im dritten Abschnitt beträgt bei den SCF-Extrakt Cremes  $84,2 \pm 14,0$  %, bei LM-Extrakt Cremes sind es nur  $51,9 \pm 10,5$  %. Hier folgen die Zubereitungen weitgehend dem Verhalten der jeweiligen Gele.

### **3.3.7 Direkte Gelherstellung im RESS-Verfahren**

Im modifizierten RESS-Verfahren (2.2.1.2.3) werden Gele durch direktes Einsprühen einer überkritischen Triterpenlösung in eine lipophile Grundlage (Jojobaöl) hergestellt. Dabei wird der Birkenkork nach der Standardmethode für das RESS-Verfahren bei 350 bar, 60 °C und minimalem Massenfluss für 3 h extrahiert. Das verwendete Setup (Abbildung 9 d) sieht den Einsatz eines Wasserbades (65 °C) zur Beheizung des Abscheidebehälters vor. Sämtliche Versuche ohne diese verbesserte Wärmeübertragung scheitern an massiver Trockeneisbildung, bedingt durch das limitierte Volumen des Abscheidezylinders. Der Abtransport der Expansionskälte, der im normalen RESS-Betrieb bereits eine Herausforderung ist, stellt bei der direkten Gelherstellung ein zentrales Problem dar. Dementsprechend ist die Erfassung der Temperaturverhältnisse nahe der RESS-Düse von entscheidender Bedeutung. Um einen stabilen Herstellungsprozess zu ermöglichen, sollte der Thermofühler durch den perforierten Deckel des Abscheidegefäßes geführt werden und möglichst nahe an der Düse lokalisiert sein. Der zweite Thermofühler am Boden des RESS-Behälters kann in diesem Setup lediglich der Kontrolle der Wasserbadtemperatur dienen. Durch diese Maßnahmen gelingt eine nur leicht verzögerte Temperaturerfassung, ähnlich des klassischen RESS-Prozesses. Trotz der relativ guten Temperaturerfassung kann es zu leichter Trockeneisbildung kommen. Dabei werden die Extraktpartikel zusammen mit erstarrtem Öl im Trockeneis fixiert. Vorsichtiges Umrühren mit einem Spatel während des Auftauens führt in diesem Fall ebenfalls zu einer homogen aussehenden Zubereitung. Die für die Abscheidung verwendeten Behälter sind im Anhang unter 7.4 näher beschrieben.

Da die durchschnittliche Ausbeute in der ersten RESS-Fraktion ca. 1800 mg beträgt, wird eine Ölmasse von 25 g eingesetzt. Bei vollständiger Aufnahme des Extraktes im Öl resultiert ein Gehalt über 6 %, was für die Ausbildung eines Gels ausreichend ist.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

In Abbildung 39 ist der Verlauf eines Amplitudensweeps für eine Zubereitung (R8.1) dargestellt, die mit direkter RESS-Extraktion ohne die Bildung von Trockeneis und ohne Nachbehandlung hergestellt wurde. Der Kurvenverlauf belegt, dass es sich um ein Gel handelt. Wie bei anderen Herstellungsmethoden, ist eine Dominanz des Speichermoduls  $G'$  über das Verlustmodul  $G''$  im LVE-Bereich zu erkennen, was auf ausgeprägte elastische Eigenschaften schließen lässt.

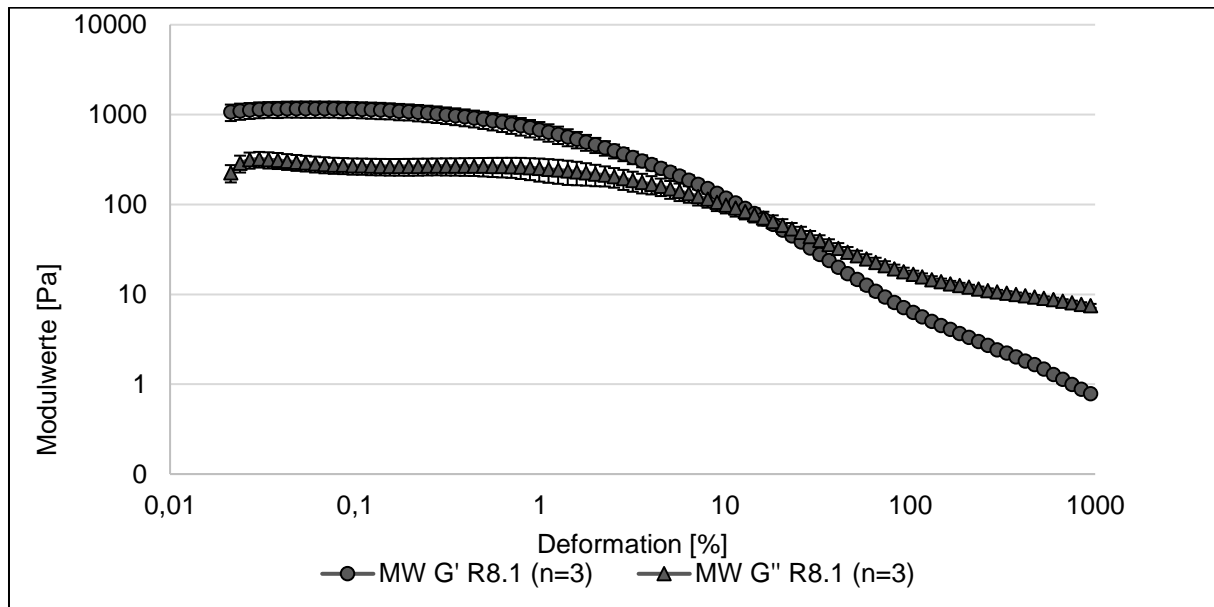


Abbildung 39: Amplitudensweep einer Zubereitung (R8.1) aus direkter Gelherstellung im RESS-Verfahren (MW  $\pm$  SD aus  $n=3$  Messungen)

Mit direkter Gelherstellung im RESS-Verfahren können somit Zubereitungen mit typischem Gelcharakter produziert werden. Der Vergleich von fünf verschiedenen Chargen (R4.1-R8.1) (Abbildung 40) aus direkter Gelherstellung zeigt ein breites Spektrum an Gelstärken von ~1400 Pa bis über 18000 Pa. Da die genaue Ausbeute an Extrakt bei dieser Herstellmethodik nicht ermittelt werden kann, ist auch der Extraktgehalt im Gel unbekannt. Dies führt zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Gelstärke. Vergleicht man die Gelstärke mit der von Zubereitungen aus klassischer Herstellung, so liegen die Werte für die Direktherstellung in einem ähnlichen Bereich.



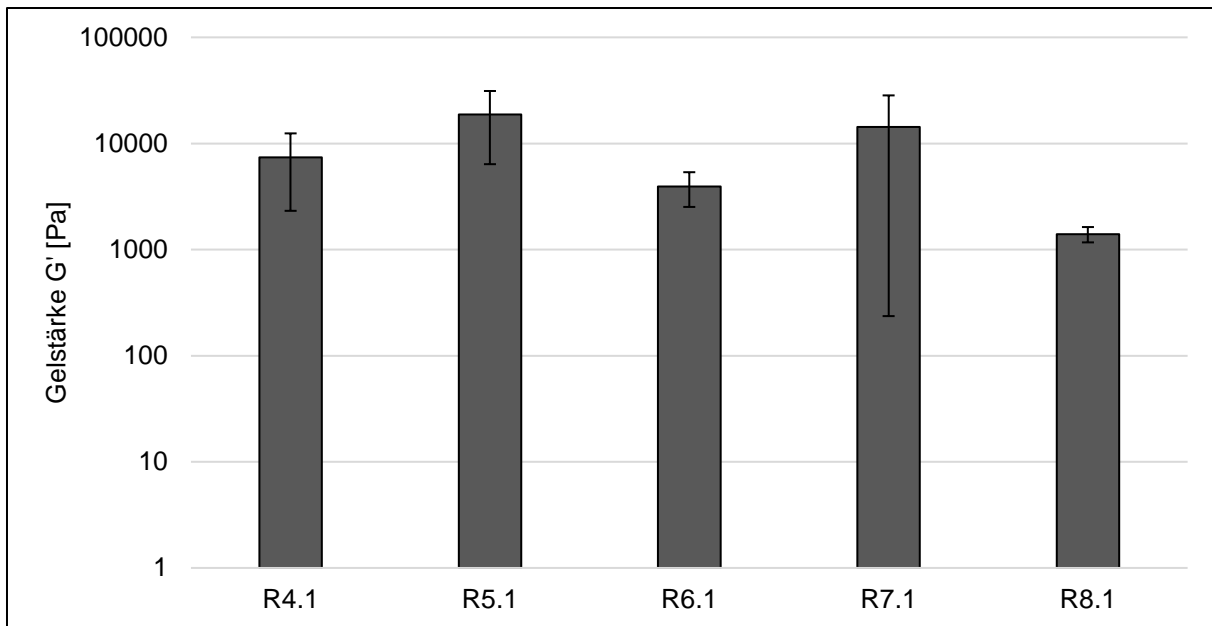


Abbildung 40: Gelstärke von Zubereitungen aus direkter Herstellung im RESS-Verfahren ( $MW \pm SD$  aus  $n=3$  Messungen)

Auffällig sind die zum Teil sehr großen Standardabweichungen innerhalb der dreifach-Messung des jeweiligen Gels. Da die Gele lediglich durch das einströmende Gas homogenisiert werden, können die großen Abweichungen innerhalb eines Gels durch eine inhomogene Extraktverteilung erklärt werden. Falls es während der Herstellung zu Trockeneisbildung kommt, wird die Homogenisierung zusätzlich erschwert. Bei Gel R7.1 sind direkt nach der Produktion kleine Klumpen aus Extrakt im Gel auszumachen. Dadurch kann die rheologische Vermessung ebenfalls beeinträchtigt sein. Eine Methode zur Verminderung der Trockeneisbildung ist die Reduktion des  $CO_2$ -Massenflusses. Die Extraktion bzw. Gelherstellung von R5.1, R6.1 und R7.1 erfolgt mit einem Massenfluss von 1,3 – 1,6 kg/h in einem für das RESS-Verfahren üblichen Bereich. Hier ist leichte Trockeneisbildung aufgetreten. Probe R8.1 wird mit durchschnittlich 0,9 kg/h am unteren Limit des Massenflusses extrahiert. Bei der Entnahme des Gels sind hier keine Anzeichen von Trockeneis vorhanden. Da die Extraktionsausbeute vom Massenfluss abhängig ist (3.1.2.3), muss damit gerechnet werden, dass die Ausbeute bei diesem Versuch geringer ausfällt als bei den anderen Extraktionen. Dies erklärt, warum diese Zubereitung die geringste Gelstärke aufweist.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

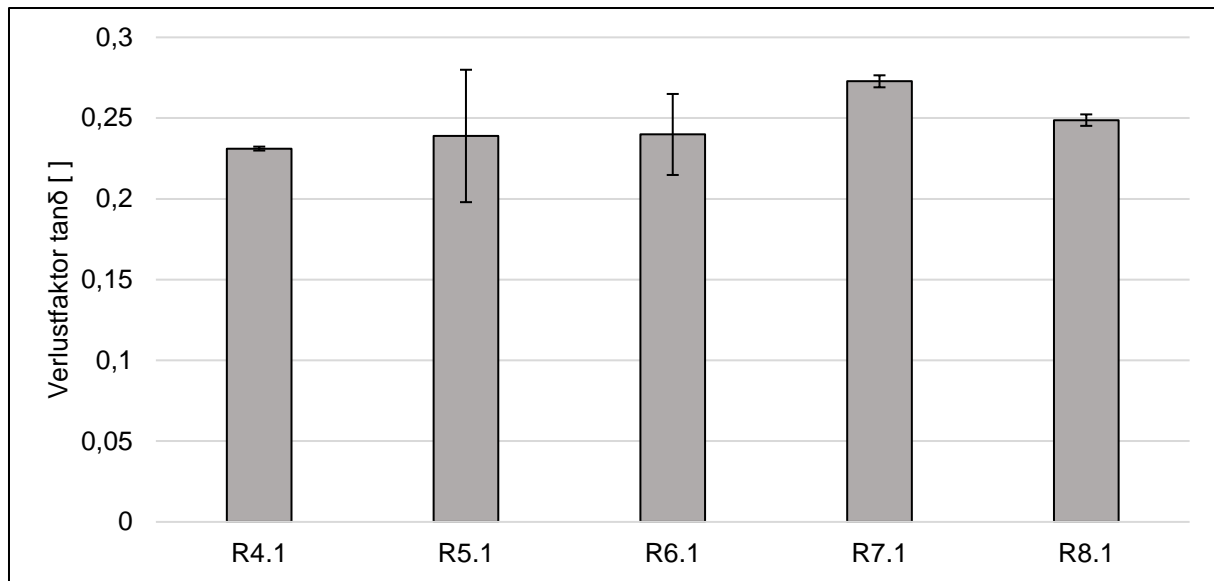


Abbildung 41: Gelcharakter von Zubereitungen aus direkter Herstellung im RESS-Verfahren ( $MW \pm SD$  aus  $n=3$  Messungen)

Der Gelcharakter (Verlustfaktor  $\tan\delta$ ) für fünf Chargen Zubereitung aus direkter RESS-Herstellung liegt zwischen 0,2 und 0,3 (Abbildung 41). Auch wenn die Gelstärke zwischen den einzelnen Chargen stark schwankt, so zeigen alle fünf Gele einen relativ konstanten Gelcharakter, der weit unter dem Grenzwert für Gele von  $\tan\delta = 1$  liegt.

#### 3.3.8 Diskussion der Mechanismen zur Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt aus überkritischer Fluidextraktion

Im Folgenden werden verschiedene Mechanismen diskutiert, die für die Unterschiede im Gelbildungsverhalten von Lösemittelextrakten und überkritischen Fluidextrakten in Frage kommen.

##### 3.3.8.1 Die spezifische Extraktoberfläche als Parameter zur Stabilisierung von Gelen mit Birkenkorkextrakt

Extrakte aus überkritischer Fluidextraktion sind, verglichen mit Lösemittelextrakten, in der Lage, Gele schneller und effektiver zu stabilisieren. Die spezifische Extraktoberfläche wird bereits als ein wichtiger Parameter für die Gelbildung in der Literatur beschrieben [2]. Es wird ein negativer Einfluss auf die Gelbildung aufgrund einer Reduktion der Extraktoberfläche durch Umkristallisierung mit Hilfe einer Soxhlet-Apparatur nachgewiesen [2]. Dies legt den Schluss nahe, dass sich Lösemittelextrakte und überkritische Fluidextrakte in ihrer spezifischen Oberfläche unterscheiden, und

dadurch die Unterschiede im Gelbildungsverhalten erklärt werden können. Ein Vergleich der REM-Aufnahmen (repräsentative Ausschnitte) der SCF-Extrakte E15 und E31 liefert Hinweise darauf, dass es Unterschiede in der Oberflächenstruktur zwischen verschiedenen SCF-Extraktchargen geben könnte (Abbildung 42). Während E15 eher großflächige Strukturen zeigt, weist E31 sehr feine Elemente auf.

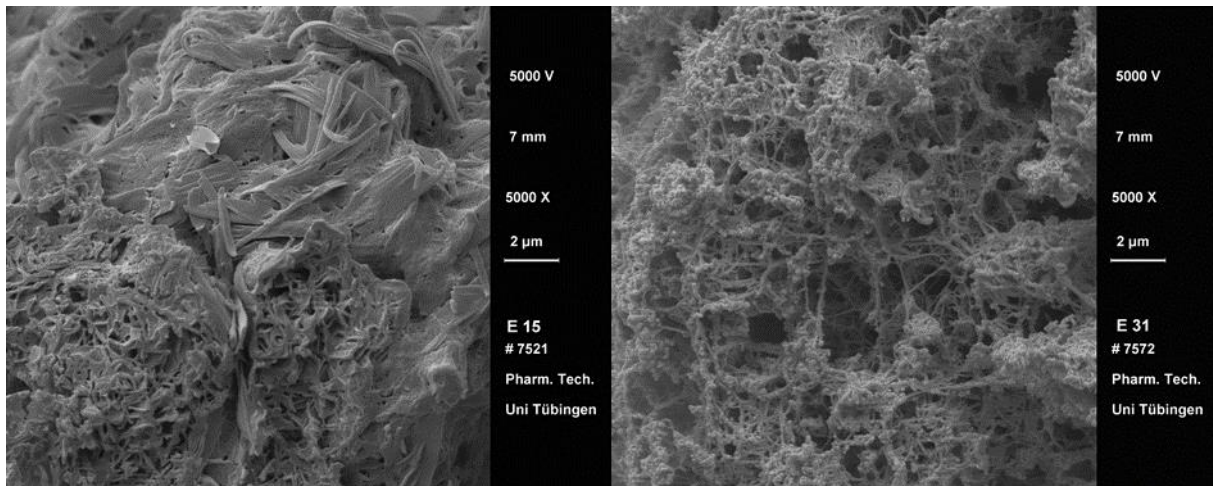


Abbildung 42: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von zwei SCF-Extrakten

Durch den unterschiedlichen Aufbau der Partikel variiert auch die spezifische Oberfläche stark. Die spezifische Oberfläche von E15 beträgt  $15,1 \text{ m}^2/\text{g}$ , was in einer Gelstärke von lediglich 136 Pa resultiert. Extrakt E31 ist bei einer spezifischen Oberfläche von  $74,3 \text{ m}^2/\text{g}$  in der Lage, Gele mit 10367 Pa auszubilden. Beide Extrakte stellen bezüglich der Oberfläche die jeweiligen Extreme dar. Auch der Zusammenhang zwischen großer Oberfläche und hoher Gelstärke scheint gegeben. Der Referenz LM-Extrakt TE1 (Gelstärke 716 Pa) weist eine spezifische Oberfläche von  $29,7 \text{ m}^2/\text{g}$  auf. Im Vergleich dazu liegt sowohl die durchschnittliche Gelstärke von neun SCF-Extrakt Gelen (Standardextraktion) mit  $4920 \pm 2228 \text{ Pa}$  als auch die spezifische Oberfläche dieser Extrakte mit  $42,4 \pm 19,9 \text{ m}^2/\text{g}$  über dem Niveau des LM-Extraktes. Auch bei diesem allgemeinen Vergleich stimmt die Korrelation zwischen großer spezifischer Oberfläche und hoher Gelstärke überein. Betrachtet man jedoch ausgewählte Extrakte im Einzelnen, so zeigt sich, dass diese direkte Korrelation keine allgemeine Gültigkeit besitzt. Als Beispiel sind hier die Extrakte mit klassischer Abscheidung und einer Extraktionstemperatur von  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  zu nennen (E28, E29). Bei einer relativ geringen spezifischen Oberfläche von  $\sim 13,6 \text{ m}^2/\text{g}$  sind diese Extrakte in der Lage, Gele auszubilden, die eine Gelstärke  $G'$  von 16700 Pa und über 20000 Pa aufweisen (Extraktionsdaten s.a. 3.1.2.2). Auch bei den Lösemittelextrakten gibt es

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Abweichungen von der Beziehung zwischen Oberfläche und Gelstärke. So ist beispielsweise TE3 in der Lage, bei einer spezifischen Oberfläche von lediglich 7,1 m<sup>2</sup>/g, Gele mit über 5000 Pa hervorzubringen. Die repräsentativen REM-Ausschnitte in Abbildung 43 verdeutlichen den Unterschied in der Oberflächenstruktur zwischen den beiden Lösemittel-extrakten TE1 und TE3. Trotz geringerer spezifischer Oberfläche und deutlich gröberer Oberflächenstruktur fungiert TE3 als wesentlich besserer Gelbildner.

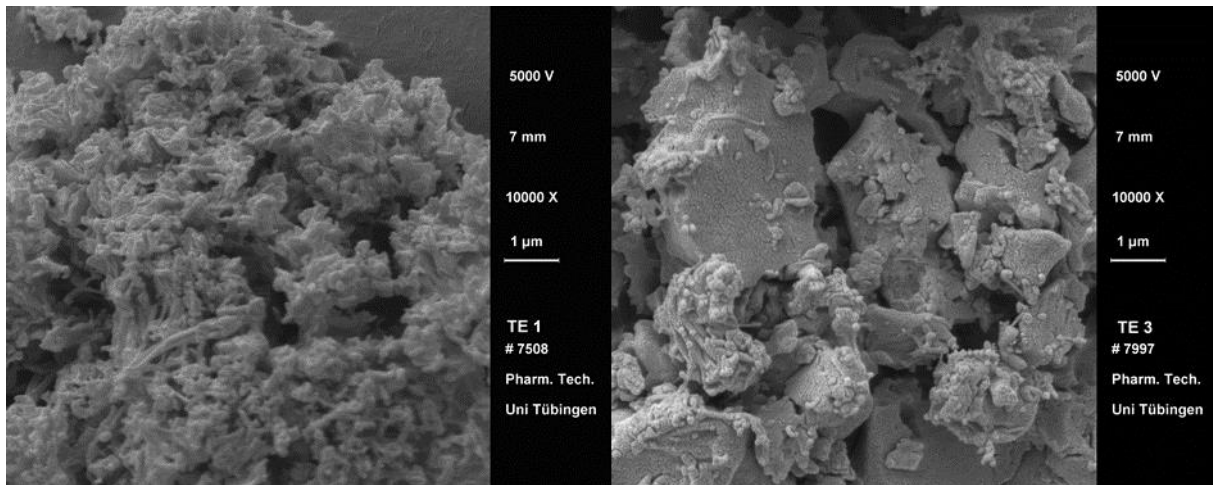


Abbildung 43: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von zwei LM-Extrakten

Bei fraktionierter RESS-Extraktion kann ebenfalls ein fehlender Zusammenhang zwischen spezifischer Oberfläche und Gelstärke gezeigt werden (Abbildung 44).

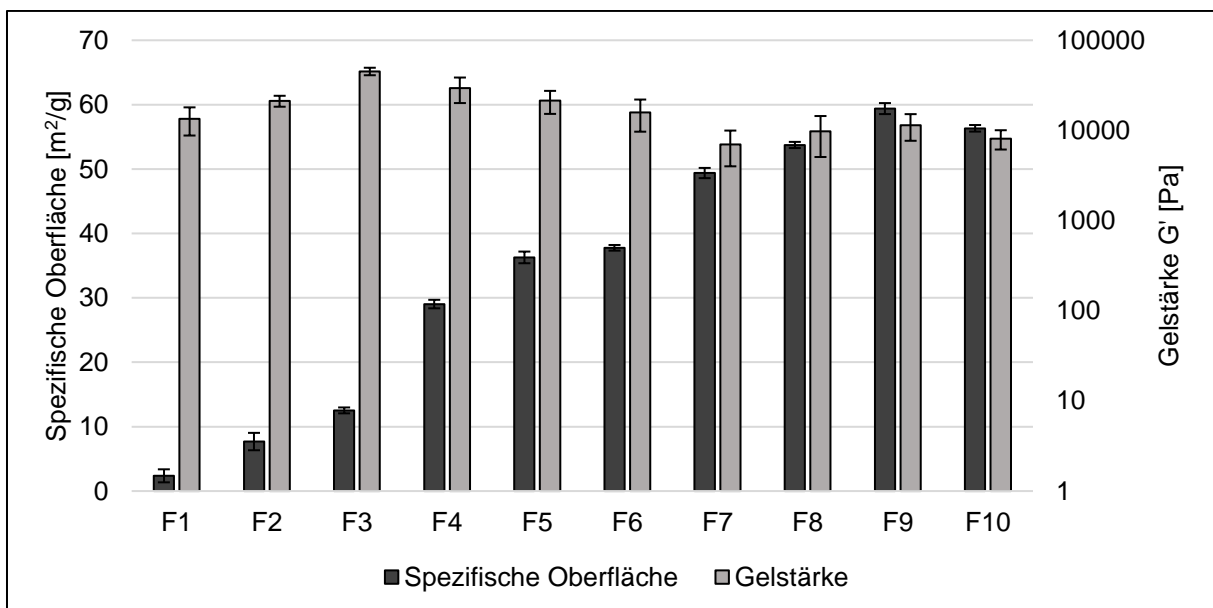


Abbildung 44: Gelstärke in Abhängigkeit von der Extraktfläche bei fraktionierter RESS-Extraktion (F1-F10) (MW ± SD; n=3 Messungen)

Auch die ersten drei RESS-Fractionen (F1-F3) mit einer spezifischen Oberfläche unter  $13 \text{ m}^2/\text{g}$  sind in der Lage, Gele mit hoher Gelstärke auszubilden. Der Anstieg der spezifischen Oberfläche im Verlauf der Extraktion bringt keine Steigerung der Gelstärke mit sich. In Abbildung 45 sind repräsentative REM-Aufnahmen der ersten (R1.1; F1) und fünften (R1.5; F5) RESS-Fraktion zu sehen. Die Aufnahme von F5 zeigt eine recht homogene und poröse Struktur. Dagegen sind in F1 neben feinen, fadenartigen Strukturen auch größere Teilchen mit glatter Oberfläche zu erkennen. Diese sind vermutlich für die geringe spezifische Oberfläche von unter  $5 \text{ m}^2/\text{g}$  verantwortlich. Eine Erklärung für die dennoch hohe Gelstärke könnten die feineren Strukturen sein. Durch die geringe Dicke der fadenartigen Strukturen im Nanometerbereich werden diese bei der Gelherstellung im Ultra Turrax zerkleinert und aufgebrochen, was eine schnelle und effektive Ausbildung des inneren Netzwerkes ermöglicht. Da gelöste Extraktmoleküle über Wasserstoffbrückenbindungen die Gelbildung beeinflussen können [2], wäre auch denkbar, dass Teile der dünneren Strukturen, bedingt durch ihre größere Oberfläche, rasch in Lösung gehen und somit den Geliervorgang unterstützen.

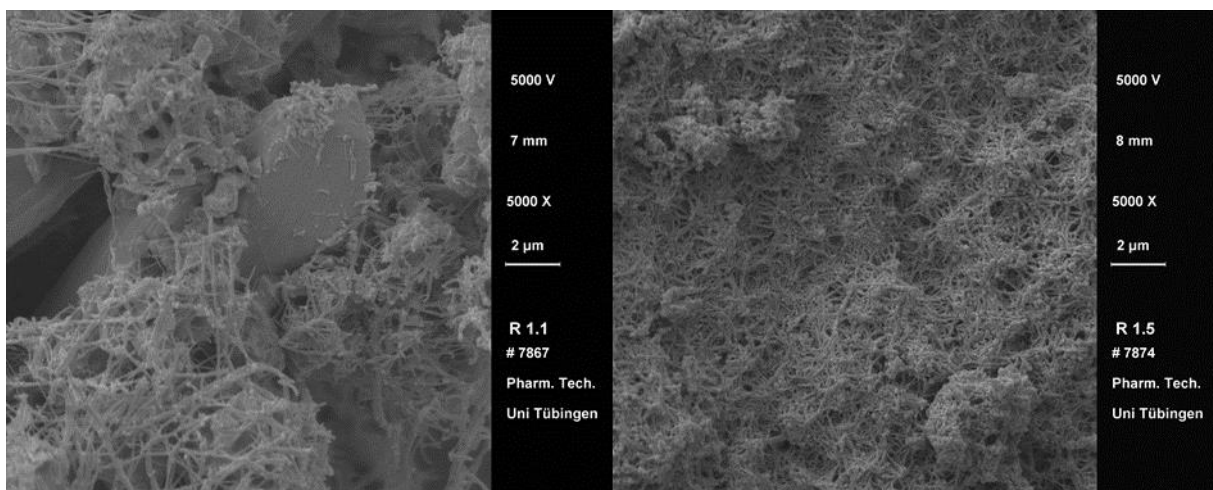


Abbildung 45: REM-Aufnahmen der Partikeloberfläche von RESS-Extrakten

Die Ergebnisse zeigen, dass es keine direkte Korrelation zwischen spezifischer Extraktfläche und der Gelstärke gibt und somit die spezifische Extraktfläche nicht der einzige entscheidende Parameter für die Ausbildung von Oleogelen sein kann.

### 3.3.8.2 Die Oberflächenenergie als Parameter zur Stabilisierung von Gelen mit Birkenkorkextrakt

Da in Gelen, die mit Birkenkorkextrakt stabilisiert sind, ein inneres Netzwerk aus Feststoffpartikeln ausgebildet wird, können Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Partikeln eine große Rolle für die Festigkeit der Gele spielen. Die Oberflächenenergie könnte dabei einen analytischen Zugang zur Charakterisierung dieser Wechselwirkungen liefern. Von vier Extrakten wird mittels inverser Gaschromatographie die dispersive Oberflächenenergie bestimmt. Jeweils zwei Extrakte besitzen eine ähnliche spezifische Oberfläche, bei deutlich unterschiedlicher Gelstärke (Tabelle 16). Verglichen wird TE1 mit E25 bei spezifischen Oberflächen von 29,6 m<sup>2</sup>/g bzw. 27,9 m<sup>2</sup>/g und E16 mit E32 bei 37,3 m<sup>2</sup>/g bzw. 36,2 m<sup>2</sup>/g. Um den Einfluss der Zusammensetzung der Extrakte auf die Gelbildung möglichst gering zu halten, werden Extrakte mit ähnlichem Triterpenegehalt zwischen 80 % und 90 % ausgewählt. Betulin als Hauptbestandteil der Extrakte, und somit wichtigem Bestandteil für das Gelbildungsverhalten, liegt bei TE1 mit knapp über 80 % etwas höher, verglichen mit den SCF-Extrakten (60-70 % BE).

Tabelle 16: Oberflächencharakteristik verschiedener Triterpentrockenextrakte mit resultierender Gelstärke

<b>Extrakt</b>	<b>Triterpenegehalt (Betulingehalt) [%]</b>	<b>Spezifische Oberfläche [m<sup>2</sup>/g] (n=3)</b>	<b>Dispersive Oberflächenenergie [mJ/m<sup>2</sup>] (n=3)</b>	<b>Gelstärke [Pa] (n=3)</b>
OS-E (TE1)	89,5 (81,6)	29,6 ± 0,3	62,42 ± 0,33	716 ± 278
SCF-E (E25)	85,2 (68,1)	27,9 ± 1,3	51,59 ± 0,47	4486 ± 888
SCF-E (E16)	82,5 (66,2)	37,3 ± 0,1	51,67 ± 0,59	2211 ± 245
SCF-E (E32)	84,8 (61,9)	36,2 ± 2,0	51,27 ± 0,65	11081 ± 1540

Bei der Betrachtung der dispersiven Oberflächenenergie fällt auf, dass alle drei SCF-Extrakte bei Werten knapp über  $51 \text{ mJ/m}^2$  liegen. Mit  $62,4 \text{ mJ/m}^2$  weist TE1 eine etwas höhere dispersive Oberflächenenergie auf (Größenordnungsvergleich: Salbutamolsulfat  $62,9 \pm 0,1 \text{ mJ/m}^2$  [113]). Da die dispersive Oberflächenenergie die lipophilen Wechselwirkungen im Extrakt repräsentiert, bedeutet dies, dass beim Lösemittelextrakt mehr unpolare Gruppen an der Oberfläche exprimiert werden. In einer vorangegangenen Arbeit wird die Stabilisierung der Gelstruktur über interpartikuläre Wasserstoffbrückenbindungen diskutiert [2]. Somit könnte die geringere dispersive Oberflächenenergie bei SCF-Extrakten ein Hinweis auf eine effektivere Gelbildung durch mehr polare Gruppen an der Extraktoberfläche sein. Ein direkter Zusammenhang zwischen der dispersiven Oberflächenenergie und der Gelstärke  $G'$  ist nicht zu erkennen. Bei vergleichbaren Werten für die dispersive Oberflächenenergie, die spezifische Oberfläche und den Triterpen- bzw. Betulingehalt, resultieren große Unterschiede im Verhalten bei der Gelbildung (Tabelle 16). Überkritische Fluidextrakte unterscheiden sich in der dispersiven Oberflächenenergie vom Lösemittelextrakt. Das Ausfällen der Extrakte aus überkritischem  $\text{CO}_2$  führt also zu veränderten Oberflächeneigenschaften, hinsichtlich der Exprimierung hydrophiler und lipophiler Gruppen an der Oberfläche. Die unterschiedlichen Löslichkeiten der einzelnen Extraktbestandteile im überkritischen  $\text{CO}_2$  können den Aufbau der Extraktpartikel beim Ausfällen beeinflussen [2]. Bei der Fällung aus organischem Lösemittel durch Abkühlung der Lösung kann sich somit ein Kern der weniger gut löslichen Triterpene bilden und Lupeol wird aufgrund seiner höheren Lipophilie an der Oberfläche der Partikel abgeschieden [2]. Durch das schlagartige Fällen des Extraktes aus überkritischer Lösung bzw. flüssiger  $\text{CO}_2$ -Phase kann die Kernbildung minimiert werden, was zur Folge hat, dass auch vermehrt hydrophilere Komponenten an der Oberfläche exprimiert werden. Dies wäre eine mögliche Begründung für die beobachteten Unterschiede der dispersiven Oberflächenenergie des Lösemittelextraktes und der überkritischen Fluidextrakte.

### **3.3.8.3 Wasserstoffbrückenbindung bei der Stabilisierung von triterpenhaltigen Gelen**

Sollte der Gelbildungsmechanismus wesentlich durch interpartikuläre Wasserstoffbrückenbindungen bedingt sein, so ist davon auszugehen, dass sich bei



### 3 Ergebnisse und Diskussion

höherer Gelfestigkeit in einem IR-Spektrum intensivere Absorptionsbanden bei  $3400\text{ cm}^{-1}$  ausbilden. In Abbildung 46 sind die IR-Spektren eines SCF-Extrakt Gels (E31) und eines LM-Extrakt Gels (TE1) zu sehen. Im Fingerprintbereich unterscheiden sich beide Spektren nur unwesentlich. Auch die Bande für Kohlenwasserstoffe (C-H Valenzschwingung) zwischen  $2800\text{ cm}^{-1}$  und  $3000\text{ cm}^{-1}$  ist bei beiden Gelen ähnlich ausgeprägt. In ihrer Gelstärke unterscheiden sich beide Zubereitungen deutlich (SCF-E:  $10367\text{ Pa}$ ; LM-E:  $715\text{ Pa}$ ) voneinander. Es wäre zu erwarten gewesen, dass die Bande bei einer Wellenzahl von  $3400\text{ cm}^{-1}$ , die für interpartikuläre Wasserstoffbrückenbindungen steht, beim SCF-Extrakt Gel, aufgrund der höheren Gelfestigkeit, stärker ausgeprägt ist. Im Schaubild (Abbildung 46) ist zu erkennen, dass genau das Gegenteil der Fall ist. Eine Begründung dafür ist in der Zusammensetzung der Extrakte zu suchen. Während in TE1  $81,6\%$  Betulin enthalten sind, ist der Gehalt in E31 mit  $54,2\%$  wesentlich geringer. Der Gehalt an Lupeol ist dafür in E31 mit  $26,1\%$ , verglichen mit TE1 ( $2,1\%$ ), deutlich höher. Da Lupeol im Gegensatz zu Betulin eine Hydroxylgruppe weniger besitzt, stehen bei E31 weniger Hydroxylgruppen für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zur Verfügung. Dies erklärt die weniger intensive Bande bei  $3400\text{ cm}^{-1}$  im IR-Spektrum für das Gel, das mit E31 stabilisiert ist. Da dieser Extrakt trotzdem in der Lage ist, sehr viel festere Gele zu bilden, müssen an der Gelbildung noch andere Mechanismen beteiligt sein. Eine Analyse der Kristallstruktur könnte weiteren Aufschluss über Unterschiede zwischen beiden Extraktarten geben (3.3.8.4).

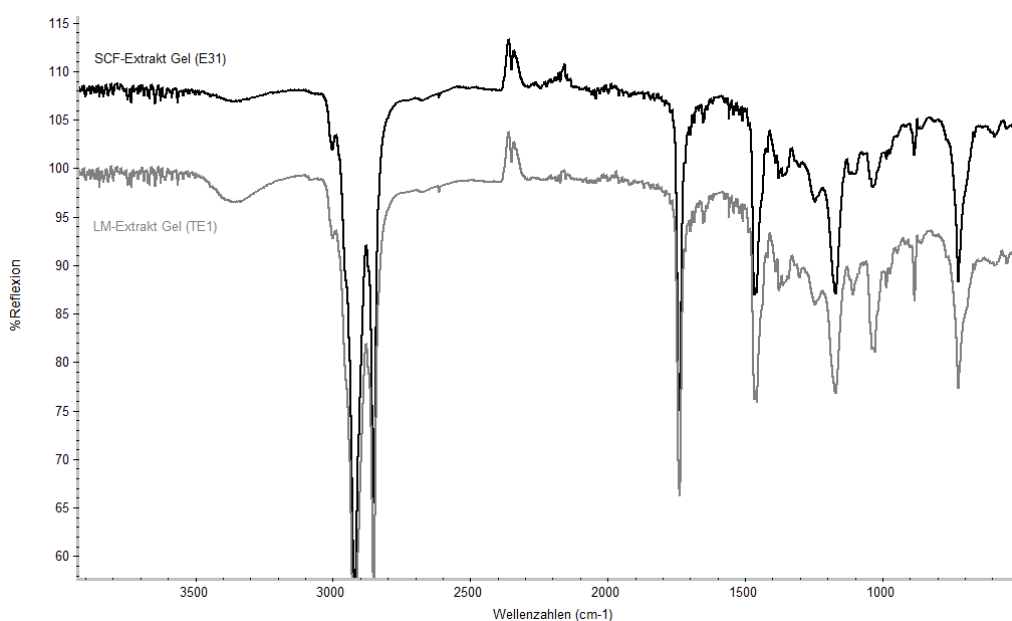


Abbildung 46: IR-Spektrum von Gelen stabilisiert mit Birkenkorkextrakt



### 3.3.8.4 Thermische Extraktanalyse mit Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Unterschiede im kristallinen Aufbau von Extrakten aus überkritischer Fluidextraktion und Lösemittelextraktion könnten für das Gelbildungsverhalten mitverantwortlich sein. Daher werden DSC-Messungen durchgeführt, um Hinweise auf amorphe oder kristalline Strukturen zu erhalten. Abbildung 47 zeigt die Thermogramme von drei SCF-Extrakten (E16; E25; E32) und von einem LM-Extrakt (TE1) im Bereich des Schmelzpunktes bei einer Heizrate von 2 K/min. Während der endotherme Schmelzpeak bei TE1 noch relativ steil verläuft, zeigen die SCF-Extrakte breitere und flachere Peaks, die zu niedrigeren Temperaturen hin verschoben sind. Bei Betrachtung der Extraktzusammensetzung wird deutlich, dass diese Verschiebung mit dem Lupeolgehalt der einzelnen Extrakte korreliert. Da Lupeol einen Schmelzpunkt um 215 °C aufweist, und Betulin bei 257 °C schmilzt, stellen sich die Schmelzereignisse der Extrakte im Bereich zwischen diesen beiden Hauptbestandteilen ein. Eine unbekannte Größe sind die nicht identifizierten Substanzen, deren Schmelzpunkt unbekannt ist und die immerhin 10 – 20 % der Extraktmasse ausmachen können.

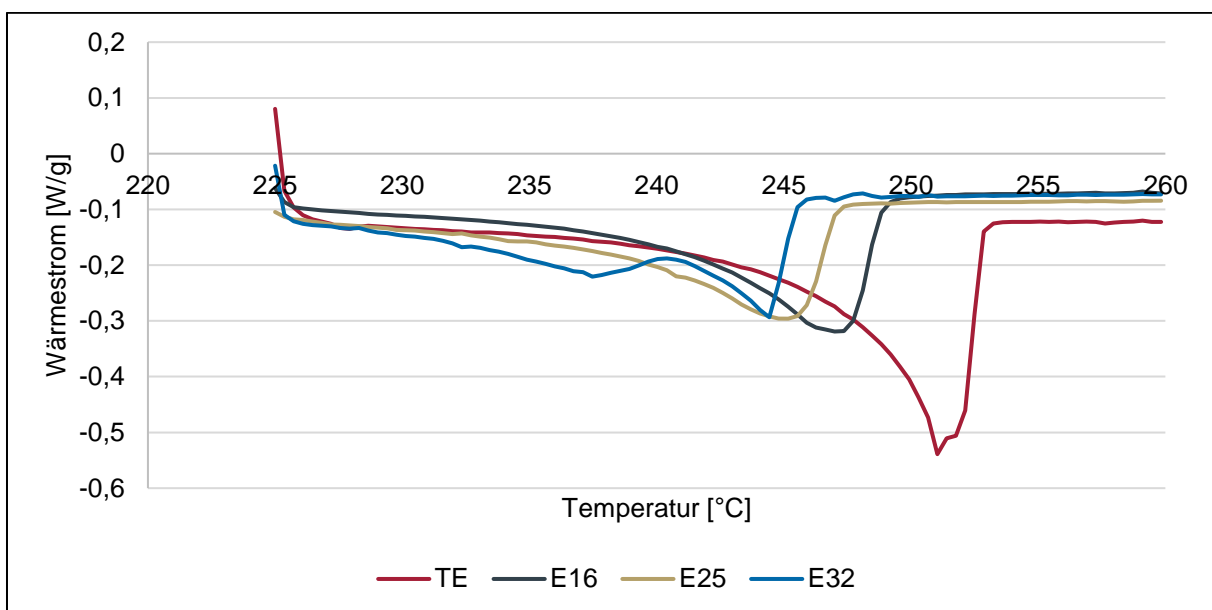


Abbildung 47: Thermogramm verschiedener Triterpentrockenextrakte

Der Effekt der unbekannt Substanzen wird im Thermogramm der RESS-Fractionen 1, 5 und 10, über einen Temperaturbereich von 50 °C bis 260 °C und einer Heizrate von 10 K/min, noch deutlicher (Abbildung 48). Fraktion 1 (R1.1) besteht zu fast 30 % aus Lupeol und zu 45 % aus nicht identifizierten Substanzen. Dies führt zu einem Thermogramm ohne ausgeprägten Schmelzpeak. Im Bereich zwischen 100 °C

### 3 Ergebnisse und Diskussion

und 150 °C kommt es zu einem leichten, endothermen Absinken der Kurve, mit einem anschließenden exothermen Ereignis, das wiederum von einem sehr breiten Schmelzpeak gefolgt wird. Der exotherme Peak deutet auf die Rekristallisation einer zuvor geschmolzenen metastabilen Form hin. Der Schmelzpunkt im Bereich von 195 °C zeigt, dass das Schmelzverhalten von R1.1 nicht von Betulin oder Lupeol bestimmt wird, sondern ein hoher Anteil niedrig schmelzender Substanzen enthalten sein muss. Mit steigendem Betulingehalt, bei sinkendem Lupeolgehalt und abnehmendem Anteil an unbekanntem Substanzen, in Fraktion 5 (R1.5) und Fraktion 10 (R1.10), ergeben sich zunehmend schärfere Schmelzpeaks bei höheren Temperaturen. Hinweise auf amorphes Verhalten der Extrakte ist in den Thermogrammen nicht zu erkennen. Untersuchungen mit Röntgendiffraktometrie könnten weiteren Aufschluss über das kristalline Verhalten der Extrakte liefern.

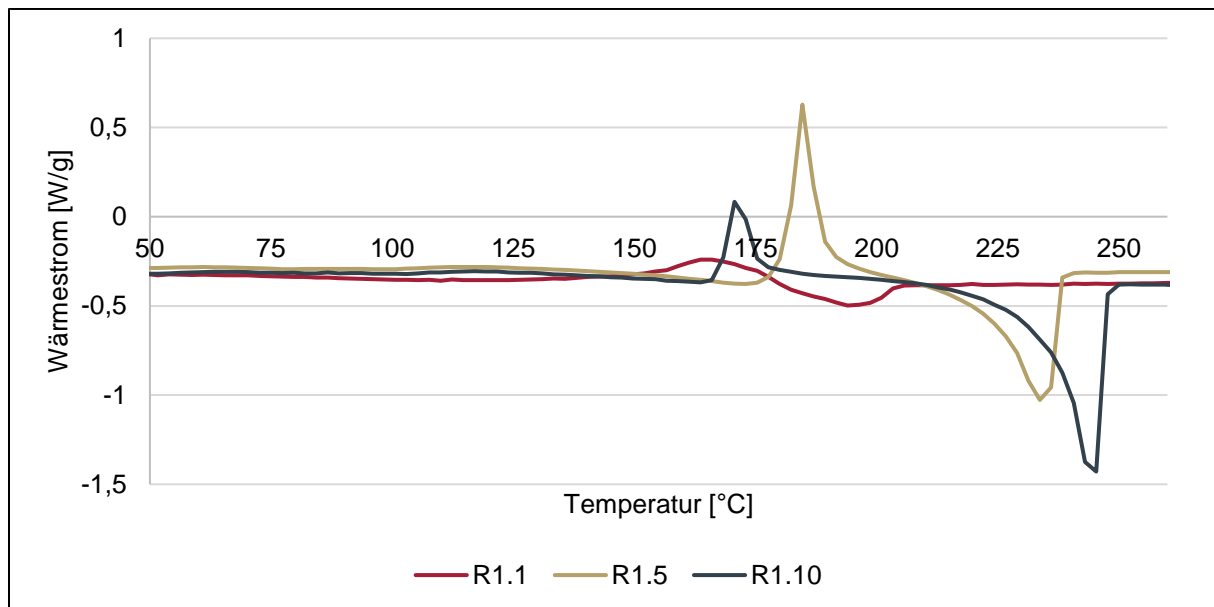


Abbildung 48: Thermogramm von fraktionierten RESS-Extrakten

Da die Schmelzpunkte der Extrakte TE1, E16, E25 und E32 nicht nur eine Korrelation mit der jeweiligen Lupeolkonzentration im Extrakt, sondern auch mit der Stärke der daraus hergestellten Gele aufweisen, wird eine Versuchsreihe mit mehreren Extrakten durchgeführt. Das Schaubild (Abbildung 49) zeigt die Gelstärke in Abhängigkeit vom Schmelzpunkt des Extraktes. Ein eindeutiger Trend ist dabei nicht zu erkennen. Es ist zwar eine leichte Tendenz zu höheren Gelstärken bei niedrigem Schmelzpunkt zu sehen, allerdings folgen dieser Tendenz nicht alle Extrakte.

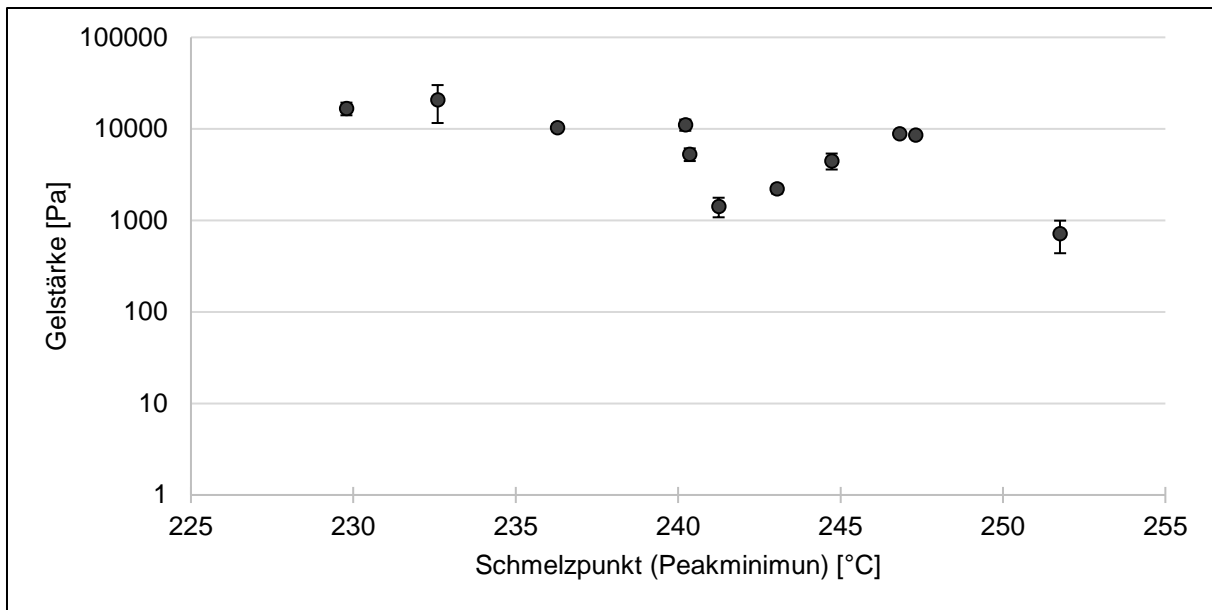


Abbildung 49: Gelstärke in Abhängigkeit vom Schmelzpunkt des stabilisierenden Extraktes (n=3)

### 3.3.9 Zusammenfassung der Stabilisierung von halbfesten Zubereitungen mit Birkenkorkextrakten

Aus den Versuchen zur Stabilisierung halbfester Zubereitungen mit Hilfe von Birkenkorkextrakt geht hervor, dass sich das Gelbildungsverhalten von Extrakten aus überkritischer Fluidextraktion deutlich von dem eines Lösemittlextraktes unterscheidet. Bei gleicher Extraktkonzentration weisen Gele, die mit SCF-Extrakt stabilisiert sind, eine wesentlich höhere Gelstärke auf, was sich in höheren Modulwerten beim Amplitudensweep und Intervall-Thixotropie-Test äußert (3.3.1). Die benötigte Zeit zur Ausbildung der inneren Gelstruktur ist bei dieser Art Extrakt gegenüber einem Lösemittlextrakt stark verkürzt (3.3.3). Versuche unter Reduktion der eingesetzten Extraktmenge im Gel zeigen, dass bei Verwendung von SCF-Extrakt, im Vergleich zum LM-Extrakt, weniger Substanz eingesetzt werden muss, um ein vergleichbares Level der Gelstärke zu erreichen (3.3.4). Im Gelcharakter, also dem Verhältnis von Verlust- und Speichermodul zueinander, unterscheiden sich die Zubereitungen aus unterschiedlicher Extraktion nur unwesentlich. Die manuelle Herstellung eines Gels durch Rühren mit einem Spatel ist mit SCF-Extrakten möglich, während der Energieeintrag zur Herstellung eines LM-Extrakt Gels nicht groß genug ist. Cremes, die mit SCF-Extrakt stabilisiert sind, weisen im Vergleich zu Cremes, die LM-Extrakt enthalten, eine höhere Viskosität auf. (3.3.5). In der maximalen Wasseraufnahmekapazität gibt es keinen Unterschied zwischen beiden

### 3 Ergebnisse und Diskussion

Zubereitungsarten (3.3.6). Die Herstellung von Gelen in direkter RESS-Extraktion gelingt im kleinen Experimentalmaßstab, unterliegt dabei aber starken Einschränkungen bedingt durch die massive Abkühlung bei der Expansion der überkritischen Lösung und durch das begrenzte Volumen des Abscheidebehälters (3.3.7).

Bei den Mechanismen zur Gelbildung wird die spezifische Oberfläche als ein wesentlicher Parameter für die Stabilisierung diskutiert [2]. In Abbildung 50 sind die Gelstärken  $G'$  von Zubereitungen aus drei Lösemittlextrakten und 17 überkritischen Fluidextrakten gegen die jeweilige spezifische Oberfläche des stabilisierenden Extraktes dargestellt.

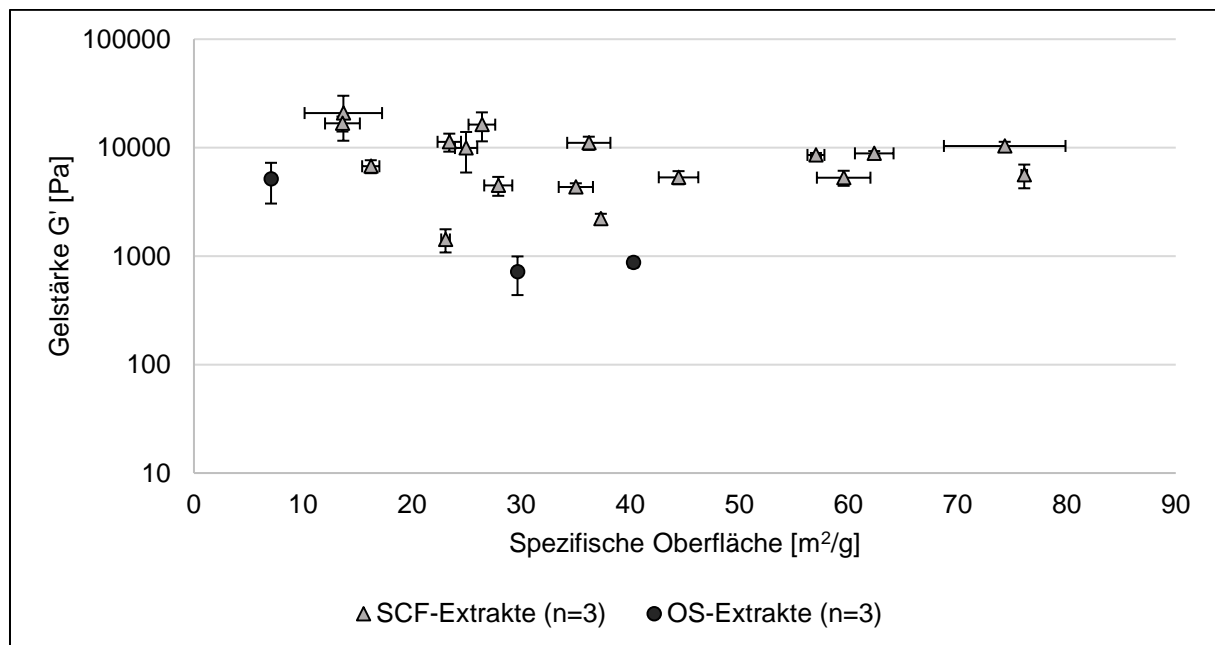


Abbildung 50: Gelstärke in Abhängigkeit der spezifischen Oberfläche des stabilisierenden Extraktes ( $MW \pm SD$ )

Eine direkte Korrelation zwischen der Gelstärke und der spezifischen Extraktoberfläche kann durch die vorliegenden Ergebnisse nicht bestätigt werden. Weiterhin könnte die Oberflächenenergie eine Rolle bei der Gelbildung spielen. Messungen zur dispersiven Oberflächenenergie ergeben Unterschiede zwischen Extrakten aus LM- und SCF-Extraktion. Ein direkter Zusammenhang zur Gelstärke besteht ebenfalls nicht (siehe auch 4.2.5.1). Interpartikuläre Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Extraktpartikeln im Gel können an der Gelbildung beteiligt sein [2]. Allerdings weisen auch Gele mit schwacher OH-Absorptionsbande im IR-Spektrum hohe Gelstärken auf. Thermische Untersuchungen

der Extrakte mit DSC zeigen Unterschiede zwischen LM- und SCF-Extrakten, die wahrscheinlich durch verschiedene Zusammensetzungen der Extrakte zu erklären sind. Höhere Lupeolgehalte in SCF-Extrakten führen dabei zu niedrigeren Schmelzpunkten und einer schwachen Tendenz zu höherer Gelstärke. Eine direkte Korrelation zwischen Schmelzpunkt, Lupeolgehalt und Gelfestigkeit kann allerdings nicht nachgewiesen werden. Der Stabilisierung von Gelen mit Birkenkorkextrakten scheinen multifaktorielle Mechanismen zugrunde zu liegen. Problematisch ist dabei, dass es sich bei Birkenkorkextrakt um ein Naturprodukt handelt, das gewissen Schwankungen und Inhomogenität unterliegt. Ebenfalls problematisch für die Extraktanalyse, bzw. für einen direkten Zusammenhang zwischen Extrakteigenschaften und Gelstärke, sind die mechanischen Kräfte, die bei der Gelherstellung vorherrschen und einen weiteren Faktor darstellen, der die Gelbildung durch Zerkleinerung der Extraktpartikel beeinflussen kann. Weitere Ausführungen dazu finden sich unter 4.2.5.

## 4 Abschlussdiskussion

Ziel der Arbeit ist es, überkritische Fluidextrakte aus Birkenrinde an der hauseigenen CO<sub>2</sub>-Extraktionsanlage der Pharmazeutischen Technologie der Universität Tübingen herzustellen. Ein Augenmerk liegt dabei auf verschiedenen Methoden zur Partikelabscheidung aus überkritischer Lösung, sowie auf der Optimierung der Extraktionsausbeute. Die gewonnenen Triterpentrockenextrakte sollen charakterisiert und für die Stabilisierung halbfester Zubereitungen nutzbar gemacht werden. Als Vergleichssubstanzen dienen Extrakte aus Lösemittlextraktion.

### 4.1 Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid

Durchgeführt werden Extraktionen mit klassischer Partikelabscheidung aus flüssiger CO<sub>2</sub>-Phase, RESS-Extraktionen mit Partizipation in die Gasphase und eine direkte Gelherstellung im RESS-Verfahren.

#### 4.1.1 Extraktion mit Partikelabscheidung im Separator (SCF-Extrakte)

##### 4.1.1.1 Optimierung der Extraktionsausbeute

Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, Extraktionen mit klassischer Partikelabscheidung erfolgreich durchzuführen. Verschiedene Extraktionsparameter haben dabei einen wesentlichen Einfluss auf die Ausbeute. Gute Bedingungen finden sich bei einer Extraktionstemperatur von 60 °C, einem Extraktionsdruck von 350 bar und einer resultierenden CO<sub>2</sub>-Dichte von ca. 850 kg/m<sup>3</sup>. Hier sind Ausbeuten von  $5,8 \pm 1,4$  % bezogen auf die Ausgangsmasse Birkenkork möglich. Bei Reduktion des Extraktionsdruckes sinkt die CO<sub>2</sub>-Dichte stark ab. Dies hat deutlich geringere Ausbeuten zur Folge. Auch eine Verringerung der Extraktionstemperatur führt zu kleineren Ausbeuten. Obwohl bei einer Extraktionstemperatur von 40 °C die Dichte des Extraktionsmittels erhöht ist, sinken die Ausbeuten aufgrund des geringeren CO<sub>2</sub>-Massenflusses. Der Effekt des Massenflusses auf die Ausbeute wird insbesondere beim Vergleich der Extraktion mit konventioneller Partikelabscheidung und der RESS-Extraktion deutlich. Je kleiner der Massenfluss, desto weniger Ausbeute ist zu erwarten. Bei fraktionierter Extraktion desselben Materials zeigt sich eine rasche Abnahme der Ausbeute nach der ersten, dreistündigen Extraktion. Dies ist ein Hinweis auf das Ende der Auswaschphase. Darauf folgende Fraktionen weisen geringere

Ausbeuten auf, was für die langsamere Diffusion der Extraktivstoffe aus der Pflanzenmatrix spricht. Die Ausbeute hängt also hauptsächlich von den Extraktionsparametern  $\text{CO}_2$ -Massenfluss und  $\text{CO}_2$ -Dichte ab. Diese können an der Anlage über den Pumpenhub bzw. über Druck und Temperatur gesteuert werden, sodass es möglich ist, akzeptable Ausbeuten zu erreichen. Ausgehend von einem durchschnittlichen Triterpengehalt von 83 % (bestimmt mit HPLC) in den hergestellten überkritischen Fluidextrakten und einem durchschnittlichen Triterpengehalt von 18,7 % [19] in Birkenkork, beläuft sich der Anteil an Triterpenen, der innerhalb von drei Stunden extrahiert werden kann, auf über 25 %. Dies bezieht sich auf den effektiv gewonnenen Extrakt, und berücksichtigt keine Verluste bei der Entnahme der Extrakte und durch Reste, die in den Rohrleitungen zurückbleiben. Auf den Einsatz von Cosolventien (Bsp.: Ethanol) zur Ausbeutensteigerung wird bewusst verzichtet, da diese anschließend in einem zusätzlichen Verfahrensschritt wieder entfernt werden müssten, um einen Trockenextrakt zu erhalten. Somit wäre der Vorteil der automatischen Entfernung des Extraktionsmittels bei der Extraktion mit überkritischen Fluiden nicht mehr gegeben und die Partikelabscheidung würde teilweise aus alkoholischer Lösung erfolgen. Das Extraktionsverfahren mit Partikelabscheidung im Separator läuft relativ stabil und lässt sich durch die automatische Erfassung der Extraktionsparameter einfach überwachen.

### 4.1.1.2 Charakterisierung von SCF-Extrakten

Um die Unterschiede zwischen den Extrakten aus überkritischer Fluidextraktion und Lösemittelextraktion zu untersuchen, wird die Triterpenzusammensetzung mittels HPLC bestimmt. Der Betulingehalt der SCF-Extrakte, die nach der Standardmethode extrahiert sind, liegt mit durchschnittlich 68,5 % unter dem Wert des LM-Extraktes (81,6 %). Beim Lupeolgehalt verhält es sich genau anders herum. Hier weisen die SCF-Extrakte mit 12,0 % Lupeol, verglichen mit 2,1 % beim LM-Extrakt, einen höheren Wert auf. Im Anteil der restlichen Substanzen (Betulinsäure, Oleanolsäure und Erythrodiol) unterscheiden sich Extrakte aus beiden Gewinnungsmethoden nur unwesentlich. Lupeol zeigt somit als das lipophilste der analysierten Triterpene eine sehr gute Löslichkeit in überkritischem  $\text{CO}_2$ . Durch Variation der Extraktionsparameter kann Einfluss auf die Zusammensetzung der Extrakte genommen werden. Niedrigere Extraktionstemperaturen, geringerer Extraktionsdruck und reduzierter Massenfluss

## 4 Abschlussdiskussion

begünstigen die Verschiebung von Betulin zu Lupeol und ermöglichen eine Anreicherung von Lupeol im Extrakt. Das Verhältnis von Betulin zu Lupeol kann somit bei der Verwendung überkritischer Fluidtechnologie über die Wahl der Extraktionsparameter eingestellt werden.

Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der Extrakte ist deren spezifische Oberfläche. Das Spektrum an spezifischen Oberflächen bei SCF-Extrakten reicht von  $15 \text{ m}^2/\text{g}$  bis zu über  $70 \text{ m}^2/\text{g}$ . Verantwortlich für dieses weite Spektrum der Extraktoberfläche ist vermutlich die schwer zu steuernde Abscheidung aus einer flüssigen  $\text{CO}_2$ -Phase über ein manuelles Ventil. Im Durchschnitt liegt die spezifische Oberfläche der SCF-Extrakte bei Standardextraktion mit  $42,4 \text{ m}^2/\text{g}$  etwas höher als beim Vergleichsextrakt aus LM-Extraktion ( $29,7 \text{ m}^2/\text{g}$ ).

Im Vergleich der dispersiven Oberflächenenergie (bestimmt mit inverser Gaschromatographie) von drei SCF-Extrakten mit einem Lösemittelextrakt zeigt sich, dass alle drei SCF-Extrakte einen ähnlichen Wert von  $51,5 \text{ mJ}/\text{m}^2$  aufweisen. Der Vergleichswert des LM-Extraktes liegt mit  $62,4 \text{ mJ}/\text{m}^2$  etwas höher, was darauf hindeuten kann, dass die Oberfläche dieses Extraktes mit lipophileren Molekülen (Lupeol) besetzt ist. Eine Hypothese zum Partikelbau von Grysko [2] beschreibt ebenfalls die Anordnung von Lupeolmolekülen an der Oberfläche der Partikel eines LM-Extraktes aus Birkenrinde. Hier könnte also ein Unterschied im Aufbau der Extraktpartikel zwischen LM- und SCF-Extraktion liegen.

### 4.1.2 RESS-Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid

Die RESS-Extraktion, bei der die überkritische Lösung durch eine Düse versprüht wird und die Partikelabscheidung somit direkt in die Gasphase erfolgt, ist ein zur klassischen Abscheidung im Separator alternatives Verfahren, um Triterpentrockenextrakte zu generieren. Ein wesentliches Problem der Prozessführung über die RESS-Düse ist die massive Abkühlung des Bereichs um die Düse bei der schlagartigen Expansion der überkritischen Lösung. Während bei konventioneller Abscheidung im Separator das Entstehen einer flüssigen  $\text{CO}_2$ -Phase als Teil des Prozesses angesehen werden kann, gilt es diese Flüssigphase beim RESS-Verfahren zu vermeiden, um die Abscheidung der Partikel in die Gasphase zu ermöglichen, was eine besonders kleine Partikelgröße zur Folge hat. Das Setup innerhalb des RESS-



Behälters sollte also so gewählt werden, dass mindestens ein Thermofühler möglichst nahe der Düse lokalisiert ist, um Temperaturschwankungen schnell zu erfassen. Optimal wären mehrere Sensoren, die es ermöglichen die Temperaturverhältnisse sowohl in der Düse als auch im Sprühkegel zu erfassen. Die Wärmeübertragung ins Innere des RESS-Behälters, und somit auf die Düse, wird durch die isolierenden Eigenschaften des gasförmigen CO<sub>2</sub> erschwert. Um dem massiven Temperatursturz entgegen zu wirken, bleibt als einzige Möglichkeit eine Limitierung des CO<sub>2</sub>-Massenflusses. Dies kann über manuelle Steuerung des RESS-Ventils erfolgen oder über den Pumpenhub der Anlage. Eine direkte Beheizung der Düse wäre eine Möglichkeit, um einen höheren Massenfluss zu realisieren, ist aber technisch schwer umsetzbar. Da sich im Verlauf der Extraktion die Düse durch abgeschiedene Partikel zusetzen kann, was an einem Temperaturanstieg und einem Abfall des Massenflusses zu sehen ist, muss eine ständige Kontrolle der Extraktionsparameter erfolgen. Durch mehrmaliges Öffnen und Schließen des RESS-Ventils kann die Düse von anhaftenden Partikeln befreit werden. Verglichen mit der konventionellen Abscheidemethode (max. 15 kg/h), ist der Massenfluss im RESS-Verfahren mit 1 – 2 kg/h sehr gering. Dies spiegelt sich in wesentlich kleineren Extraktionsausbeuten wider. In der ersten Fraktion der RESS-Extraktion (3 h) beträgt die Ausbeute lediglich 1 %, bezogen auf die eingesetzte Masse an Birkenkork. Für die Produktion größerer Extraktchargen ist das RESS-Verfahren somit nur bedingt geeignet, könnte aber bei entsprechender Modifizierung eine vielversprechende Alternative zur klassischen Abscheidung im Separator sein.

### **4.1.2.1 Charakterisierung von RESS-Extrakten**

Bei der Zusammensetzung der RESS-Extrakte ist die Verschiebung von Betulin zu Lupeol, die bereits bei den SCF-Extrakten beschrieben wird (4.1.1.2), vor allem in den ersten Fraktionen besonders ausgeprägt. Der langsame Massenfluss sorgt dafür, dass vermehrt Lupeol extrahiert wird (~30 % Lupeolgehalt). Auch die nicht identifizierten Substanzen gehen bei dieser Methode leicht in Lösung und sind mit einem Gehalt von über 40 % in der ersten Fraktion zu finden. Betulin dagegen ist mit unter 25 % relativ wenig enthalten. Bei Herstellung weiterer Extraktchargen aus demselben Material steigt der Gehalt an Betulin immer weiter an, während der Lupeolgehalt und der Anteil nicht identifizierter Substanzen weiter abnimmt. Die fraktionierte Extraktion mit

## 4 Abschlussdiskussion

überkritischem CO<sub>2</sub> bei geringem Massenfluss ist also eine Möglichkeit, um Extrakte mit einer bestimmten Zusammensetzung herzustellen und gezielt Einfluss auf den Gehalt an Lupeol und Betulin zu nehmen.

Hinsichtlich der spezifischen Extraktoberfläche ist bei fraktionierter RESS-Extraktion ein Trend erkennbar. Frühe Fraktionen weisen teilweise eine, für Triterpentrockenextrakte untypische, geringe Oberfläche von unter 3 m<sup>2</sup>/g (R1.1) auf. Der Wert für die spezifische Oberfläche steigt mit fortschreitender Extraktion auf Werte über 55 m<sup>2</sup>/g (R1.10) an. Durch den steigenden Betulingehalt späterer Fraktionen wird also die Ausbildung einer größeren Oberfläche, unter den gegebenen Bedingungen, bei der RESS-Abscheidung begünstigt. Eine Übersättigung der Lösung als treibende Kraft für das Ausfallen fester Partikel wird beim RESS-Verfahren schlagartig herbeigeführt. Je höher die Übersättigung, desto eher entstehen neue Nukleationskerne. Bei geringer Übersättigung dagegen ist das Partikelwachstum gegenüber der Neubildung begünstigt. Verglichen mit Lupeol und den nicht identifizierten Substanzen weist Betulin eine schlechtere Löslichkeit in überkritischem CO<sub>2</sub> auf. Kleinere Partikel mit größerer Oberfläche bei fortschreitender Extraktion könnten somit auf eine stärkere Übersättigung des Mediums mit Betulin, bei der Entstehung der Partikel, zurückzuführen sein.

### 4.1.3 Direkte Gelherstellung durch RESS-Extraktion von Birkenrinde

Es soll ein Verfahren entwickelt werden, das es ermöglicht, ein triterpenstabilisiertes Gel in einem einzigen Prozessschritt herzustellen. Die Methode umfasst die Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem CO<sub>2</sub>, die Abscheidung des Extraktes aus überkritischer Lösung und das Einarbeiten des Extraktes in eine lipophile Grundlage. Dazu wird das RESS-Verfahren modifiziert, indem ein Kunststoffzylinder als Abscheidegefäß genutzt wird. In diesem Gefäß wird die lipophile Grundlage vorgelegt und die überkritische Lösung über eine RESS-Düse eingeleitet.

Prinzipiell ist es möglich Gele im Direktverfahren herzustellen. Diese liegen in ihrer Gelstärke im Bereich eines Gels, das mit 6 % Extrakt stabilisiert ist. An der verwendeten Anlage stößt man aber mit diesem Verfahren an die Grenzen der Durchführbarkeit. Bedingt durch den geringen Massenfluss im RESS-Verfahren ist auch mit geringen Ausbeuten an Extrakt zu rechnen. Dementsprechend muss die

Ölmenge, und dadurch bedingt das Abscheidegefäß, an die zu erwartende Ausbeute angepasst werden. Das geringe Volumen des Abscheidebehälters limitiert den Massenfluss zusätzlich, da die Bildung von Trockeneis bei der Expansion der überkritischen Lösung verhindert werden muss, um ein homogenes Produkt zu erzielen. Auch unter Einsatz eines temperierten Wasserbades zum Abtransport der Expansionskälte vom Abscheidebehälter, gelingt es nur unzureichend der Abkühlung entgegenzuwirken. Dies macht sowohl eine intensive Überwachung als auch eine ständige, manuelle Regulation des Prozesses erforderlich. Im größeren Maßstab, mit der Möglichkeit zur effektiven Beheizung des Abscheidebehälters und umfassender Temperaturkontrolle, könnte es aber gelingen einen stabilen Prozess zu entwickeln.

## **4.2 Stabilisierung halbfester Zubereitungen mit Birkenkorkextrakt aus überkritischer Fluidtechnologie**

Triterpenhaltige Trockenextrakte aus Birkenrinde können eingesetzt werden, um Gele und Cremes zu stabilisieren, was einen Verzicht auf klassische Gelbildner und Emulgatoren ermöglicht [2]. Bislang werden dafür Extrakte aus Lösemittlextraktion eingesetzt. Wie unter 4.1 beschrieben, gelingt es mit überkritischer Fluidextraktion Triterpentrockenextrakte aus Birkenrinde herzustellen. Diese sollen hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stabilisierung halbfester Zubereitungen untersucht und mit Extrakten aus Lösemittlextraktion verglichen werden.

### **4.2.1 Gelstärke, Gelcharakter und thixotropes Verhalten von Zubereitungen stabilisiert mit überkritischen Fluidextrakten**

In vorangegangenen Arbeiten wird ein Gehalt von 6 % (m/m) als ausreichend für die Gelbildung von Birkenkorkextrakt in Jojobaöl beschrieben [2]. Ausgehend davon werden Gele mit LM-Extrakt (n=2), SCF-Extrakt (n=9) und RESS-Extrakt (n=11) hergestellt und nach 24 h einem Amplitudensweep und einem Intervall-Thixotropie-Test unterzogen. Sämtliche Proben zeigen ein Verhalten, das typisch für halbfeste Zubereitungen mit pseudoplastischem Fließverhalten ist. Bei moderater Scherrate dominiert der Speichermodul über den Verlustmodul, bis es ab einer gewissen Scherbeanspruchung zum Abbau der inneren Struktur und zum Cross-over der beiden Kurven kommt. Dieser Punkt markiert den Übergang vom Gel zum Sol. Sowohl

## 4 Abschlussdiskussion

Extrakte aus Lösemittlextraktion als auch Extrakte, hergestellt mit überkritischer Fluidextraktion, sind also in der Lage derartige Gele mit Jojobaöl auszubilden. Der Verlustfaktor  $\tan \delta$ , also das Verhältnis von Verlustmodul zu Speichermodul, liegt unabhängig von der Extrakterstellung deutlich unter eins, was den Gelcharakter unterstreicht. Unterschiede zwischen den Gelen mit verschiedenen Extrakten zeigen sich in der Gelstärke und damit in ihrer Konsistenz. Schon bei der Entnahme von Proben mit einem Spatel ist die höhere Viskosität der Gele aus überkritischer Fluidtechnologie zu erkennen. Bestätigt wird dies durch das deutlich höhere Niveau der Speichermodulwerte von SCF-Extrakt Gelen und RESS-Extrakt Gelen. Bei LM-E Gelen beträgt die Gelstärke  $\sim 800$  Pa, während bei SCF-E Gelen Werte von durchschnittlich  $4920$  Pa und bei RESS-E Gelen von über  $17000$  Pa erreicht werden. Die Gele mit überkritischen Fluidextrakten zeigen dabei eine sehr große Spannweite (SCF-E:  $\sim 1400$ - $8900$  Pa; RESS-E:  $\sim 8100$ - $45000$  Pa). Diese großen Unterschiede zwischen den einzelnen Chargen sind den schwer zu kontrollierenden Bedingungen bei der Abscheidung aus überkritischer Lösung geschuldet.

Betulin als Hauptbestandteil der Lösemittlextrakte wird bisher für die Gelbildung verantwortlich gemacht [2]. Obwohl SCF- und RESS-Extrakte einen deutlich niedrigeren Betulingehalt als die LM-Extrakte aufweisen, sind wesentlich höhere Gelstärken möglich. Vom Betulingehalt an sich kann also nicht auf die Fähigkeit zur Stabilisierung halbfester Zubereitungen geschlossen werden. Im Intervall-Thixotropie-Test zeigen alle untersuchten Gele bei moderater Scherung einen Wiederaufbau der Gelstruktur nach vorangegangener Überschreitung des Gel-Sol Übergangs. Innerhalb der vorgegebenen Zeit von  $15$  min erreichen LM-E Gele, sowie SCF-E Gele ca.  $50$  % des Ausgangsniveaus der Gelstärke. Für RESS-E Gele liegt der Wert mit  $\sim 65$  % etwas höher. Ohne Sieben des LM-E wird lediglich ein Wert von  $30$  % erreicht. Die vorherige Desagglomeration der Extraktpartikel scheint demnach einen Einfluss auf das thixotrope Verhalten der Gele zu haben.

### 4.2.2 Veränderung der Geleigenschaften über die Zeit

Da der Aufbau der inneren Netzwerkstruktur in einem Gel eine gewisse Zeit benötigt, wird die Gelbildungsgeschwindigkeit von SCF-Extrakt Gelen mit der von LM-Extrakt Gelen verglichen. Dabei zeigt sich, dass die Gelbildung beim SCF-Extrakt Gel schneller verläuft. Über die Zeit nimmt die Gelstärke für beide Zubereitungsarten zu.

Allerdings erreicht das Gel mit SCF-E seine endgültige Gelstärke bereits nach ca. acht Tagen, während dies beim LM-E Gel über zwei Monate dauert. Auch innerhalb der ersten sechs Stunden der Gelbildung unterscheidet sich die Gelbildungsgeschwindigkeit beider Zubereitungen. Sowohl die Gelstärke als auch der Gelcharakter sind beim SCF-E Gel direkt nach der Herstellung bereits stark ausgeprägt. Auch in dieser frühen Phase der Gelbildung benötigt der LM-E mehr Zeit für den Strukturaufbau. Eine Begründung dafür könnte in Unterschieden der Oberflächenstruktur der Extrakte zu finden sein, die eine schnellere Ausbildung des Netzwerkes beim SCF-E Gelen ermöglicht. Da Wasserstoffbrückenbindungen für den Gelbildungsmechanismus verantwortlich sein können, wäre denkbar, dass sich bei diesen Extrakten beim Ausfällen vermehrt Moleküle mit Hydroxylgruppen (Betulin) an der Oberfläche der Partikel abscheiden. Dies würde einen schnelleren Strukturaufbau durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen ermöglichen. Die Größe der Extraktpartikel in der Zubereitung könnte ebenfalls eine Rolle bei der Gelbildungsgeschwindigkeit spielen. Sollte bei der Herstellung im Ultra Turrax die Zerkleinerung der SCF-Extrakt Partikel effektiver sein, als dies beim LM-Extrakt der Fall ist, so wäre die Gelbildung durch eine kleinere Partikelgröße begünstigt, da mehr Oberfläche zum Aufbau von Wechselwirkungen zwischen den Partikeln zur Verfügung steht. Geringere Gelstärken bei der manuellen Herstellung durch Rühren der Zubereitung mit einem Spatel liefern ebenfalls einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Zerkleinerung der Partikel bei der Gelherstellung und der resultierenden Gelstärke.

### **4.2.3 Einfluss des Extraktgehaltes auf die Gelbildung**

Sollte die Zerkleinerung der Extraktpartikel bei der Herstellung einen Einfluss auf die Gelbildung haben, so wäre ein Unterschied in der minimal für die Gelbildung notwendigen Extraktmenge zwischen SCF-E und LM-E denkbar. Unterhalb dieser minimalen Extraktkonzentration ist, durch die räumliche Trennung der Partikel, die Ausbildung eines Netzwerkes nicht mehr möglich. Bei gleicher Masse an Extrakt, aber kleineren Partikelgrößen, könnte die Struktur evtl. trotzdem aufgebaut werden. Die Ergebnisse mit unterschiedlichen Extraktkonzentrationen bestätigen diese Vermutung. Für LM-E liegt die minimal notwendige Menge an Extrakt bei ~2 % (m/m). Wird dagegen SCF-E eingesetzt, so ist nur die Hälfte (1 % (m/m)) an Extrakt nötig, um ein

Gel zu bilden. Bei der gleichen Menge LM-Extrakt kommt es zu sichtbarer Sedimentation des Extraktanteils und die Gelbildung bleibt aus.

### **4.2.4 Stabilisierung von Cremes mit überkritischen Fluidextrakten aus Birkenrinde**

Die Ergebnisse zeigen, dass überkritische Fluidextrakte aus Birkenrinde, ebenso wie entsprechende Lösemittelextrakte, in der Lage sind, Cremes aus Wasser, Jojobaöl und Extrakt zu stabilisieren. Auf die maximale Wasseraufnahmefähigkeit der Zubereitung hat der Einsatz von SCF-Extrakten keinen positiven Einfluss.

### **4.2.5 Extraktanalytik und Mechanismen zur Gelbildung**

In einer vorangegangenen Arbeit wird die spezifische Extraktoberfläche als wesentlicher Parameter für die Gelbildung diskutiert. Als Mechanismus wird die Ausbildung eines partikulären Netzwerkes beschrieben, das über Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Extraktpartikeln stabilisiert wird. Gelöste Moleküle mit Hydroxylgruppen sollen diese Stabilisierung weiter verstärken [2].

#### **4.2.5.1 Extraktoberfläche und Gelbildung**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es keinen grundsätzlichen, direkten Zusammenhang zwischen der spezifischen Extraktoberfläche und der Fähigkeit zur Gelbildung gibt. Dies gilt sowohl für Extrakte aus überkritischer Fluidextraktion, als auch für Lösemittelextrakte aus Birkenkork. Eine Analyse der dispersiven Oberflächenenergie zeigt Unterschiede zwischen beiden Extraktarten, allerdings besteht auch hier keine direkte Korrelation mit der Gelfestigkeit. Weiterführend könnte versucht werden, die polaren Komponenten der Oberflächenenergie mit inverser Gaschromatographie zu analysieren. Der analytische Zugang zur Oberflächenenergie über Kontaktwinkelmessungen gestaltet sich schwierig, da bei allen gängigen Methoden (Sitzender Tropfen, modifizierte Wilhelmy-Platte, Washburn-Methode) der Prüfkörper unter anderem mit lipophilen Lösemitteln in Kontakt kommt. Bei der guten Löslichkeit der Extrakte in unpolaren Medien würde dies die Messung stark verfälschen.

Das Oberflächenverhalten der Extrakte scheint dennoch eine entscheidende Rolle bei der Herstellung von Gelen zu spielen. Es gibt Hinweise darauf, dass der Energieeintrag, und damit einhergehend die Zerkleinerung der Extraktpartikel, bei der Gelherstellung einen Einfluss auf die spätere Gelfestigkeit hat. So bildet sich bei manuellem Einrühren des Extraktes in die Grundlage ein recht schwaches Gel bei SCF-Extrakten aus und bei LM-Extrakten bleibt die Gelbildung gänzlich aus. Unter Nutzung eines Ultra Turrax bei der Herstellung findet bei allen untersuchten Extrakten Gelbildung mit wesentlich höheren Gelstärken statt. Ähnliche Beobachtungen sind auch von Ghaffar (2016, persönliche Mitteilung) beim Dispergieren von Extraktpartikeln mit unterschiedlichen Methoden (Ultra Turrax, Spritze-Spritze, Lab Mixer und Kolbenhomogenisator) gemacht worden. Das Aufbrechen der Extraktoberfläche, bzw. die Desagglomeration größerer Aggregate in ihre Primärpartikel, scheint ein wichtiger Schritt für die Gelbildung zu sein. Auf die Ergebnisse dieser Arbeit übertragen, bedeutet dies, dass die Desagglomeration bei SCF-Extrakten während der Gelherstellung generell leichter gelingt, verglichen mit den getesteten Lösemittlextrakten. Weiterführende Analytik könnte sich mit der Bestimmung der Größe und Form der Extraktpartikel im fertigen Gel beschäftigen. Dieser analytische Zugang ist allerdings schwer zu realisieren, ohne die Gelstruktur zu verändern.

### **4.2.5.2 Wasserstoffbrückenbindungen zur Stabilisierung der Gelstruktur**

In einer Arbeit von Grysko 2011 [2] wird die Beteiligung von Wasserstoffbrückenbindungen an der Gelbildung nachgewiesen. Dementsprechend sollte im IR-Spektrum bei hoher Gelstärke eine intensivere OH-Bande auftreten. IR-Spektren von Gelen, die mit überkritischen Fluidextrakten stabilisiert sind, weisen trotz höherer Gelstärke geringere OH-Absorptionsbanden auf. Somit muss davon ausgegangen werden, dass noch andere Mechanismen an der Gelbildung beteiligt sind. Der hohe Anteil an nicht identifizierten Substanzen in SCF-Extrakten macht es dabei schwierig diese zu erfassen.

### **4.2.5.3 Fazit zu den Mechanismen der Gelstabilisierung**

Die Frage nach dem Gelbildungsmechanismus kann im Zuge dieser Arbeit nicht vollständig aufgeklärt werden. Durch die komplexe Zusammensetzung der Extrakte, mit teilweise bis zu 40 % unbekanntem Bestandteilen, wird die Analyse der Gelbildung erschwert. Von einer Beteiligung dieser Substanzen an der Gelbildung muss ausgegangen werden, da trotz hohem Massenanteil sehr stabile Gele gebildet werden können, obwohl der Gehalt an Betulin in diesen Extrakten dementsprechend geringer ausfällt. Weiteren Aufschluss über Vorgänge bei der Stabilisierung könnte die Identifizierung dieser Substanzen liefern. Die Oberflächenbeschaffenheit der Extrakte scheint für die spätere Gelstärke von Bedeutung zu sein. Eine Analyse der Oberfläche mit einer Vorhersage der zu erwartenden Gelstärke gestaltet sich jedoch schwierig, da bei der Gelherstellung die Oberflächeneigenschaften verändert werden.



## 5 Zusammenfassung

Triterpenhaltige Birkenkorkextrakte können genutzt werden, um klassische Emulgatoren und Gelbildner in Cremes und Gelen zu ersetzen. Abgesehen von dieser galenischen Nutzung, weisen besagte Extrakte auch pharmakologische Effekte auf. Insbesondere die wundheilungsfördernden Eigenschaften machen die Anwendung in halbfesten Zubereitungen interessant. Die antibakterielle Wirkung der Extrakte macht dabei eine zusätzliche Konservierung überflüssig. Die Herstellung dieser Extrakte erfolgt bislang durch Extraktion mit organischen Lösemitteln. Ziel dieser Arbeit ist es, Verfahren zur Extraktion von Birkenrinde mit überkritischem Kohlendioxid zu entwickeln, die Extrakte zu charakterisieren und für die Stabilisierung halbfester Zubereitungen nutzbar zu machen. Vorteile dieses Extraktionsprinzips sind der Verzicht auf umweltschädliche, gesundheitsbedenkliche Lösemittel und die automatische Entfernung des Extraktionsmediums im Verlauf des Extraktionsprozesses.

Im Labormaßstab mit 50 – 200 g Birkenrinde gelingt die Extraktion bei klassischer Partikelabscheidung in einem Separator aus flüssiger CO<sub>2</sub>-Phase. Die Extraktion bei 350 bar Extraktionsdruck, 60 °C Extraktionstemperatur, einer CO<sub>2</sub>-Dichte von 850 kg/m<sup>3</sup> und einem CO<sub>2</sub>-Massenfluss von 12 – 14 kg/h liefert eine Ausbeute von ca. 6 %, bezogen auf die Ausgangsmasse. Unter Anwendung des RESS-Verfahrens, bei dem die überkritische Lösung durch eine Kapillardüse direkt in die Gasphase gesprüht wird, muss der Massenfluss drastisch reduziert werden, um die Abkühlung im Düsenbereich, und die damit einhergehende Trockeneisbildung, zu minimieren. Dadurch sinkt die Extraktionsausbeute auf ~1 %. Veränderungen von Druck und Temperatur senken ebenfalls die Ausbeute, können aber genutzt werden, um die Triterpenzusammensetzung des Extraktes zu beeinflussen. Der Gehalt an Betulin, Lupeol, Erythrodiol, Betulinsäure und Oleanolsäure kann auch durch fraktionierte Extraktion beeinflusst werden. Frühe Fraktionen zeigen dabei einen erhöhten Lupeolgehalt, sowie einen hohen Anteil nicht identifizierter Substanzen, zulasten von Betulin. Mit fortschreitender Extraktion verschiebt sich dieses Verhältnis immer weiter in Richtung Betulin. Die Bestimmung der Zusammensetzung wird durch eine eigens dafür entwickelte HPLC-Methode ermöglicht.

Des Weiteren wird ein Verfahren zur direkten Gelherstellung im Zuge des Extraktionsprozesses entwickelt. Die überkritische Extraktlösung wird durch die RESS-

## 5 Zusammenfassung

Düse direkt in eine lipophile Grundlage (Jojobaöl) gesprüht, um ein Gel zu erhalten. Da die RESS-Düse bei diesem Verfahren in einem relativ kleinen Abscheidebehälter lokalisiert ist, tritt die Temperaturproblematik des RESS-Verfahrens noch stärker auf. Auch der Einsatz eines temperierten Wasserbades zur besseren Wärmeübertragung, kann der Abkühlung nur unzureichend entgegenwirken, was zu einem instabilen Prozess führt, der ständige manuelle Kontrolle erfordert. Unter effektiverer Beheizung der Düse könnte das Verfahren jedoch gute Ergebnisse liefern.

Die Charakterisierung des rheologischen Verhaltens von Gelen, die mit überkritischen Fluidextrakten und Lösemittelextrakten aus Birkenrinde stabilisiert sind, erfolgt mit Amplitudensweeps und Intervall-Thixotropie-Tests. Für beide Extraktarten zeigen die Zubereitungen ein für Gele typisches Verhalten, mit einer Dominanz der elastischen Eigenschaften im linear visko-elastischen Bereich, über das viskose Verhalten. Bei zunehmender Scherbeanspruchung kommt es zum Gel-Sol Übergang mit anschließender Rückbildung der Gelstruktur (Thixotropie). Gele, die mit überkritischen Fluidextrakten stabilisiert sind, zeigen allerdings bei gleichem Feststoffgehalt eine deutlich höhere Gelstärke und Viskosität, verglichen mit Gelen, die Lösungsmittelextrakt enthalten. Eine Untersuchung zur Gelbildungsgeschwindigkeit belegt auch einen deutlich schnelleren Aufbau des inneren Gelnetzwerkes für diese Extrakte. Während bei Zubereitungen mit LM-Extrakt mindestens 2 % Extrakt eingesetzt werden müssen, um ein Gel zu erhalten, sind bei Einsatz von SCF-Extrakten lediglich 1 % Extrakt nötig, um eine ähnliche Gelstärke zu erhalten.

Bei der Oberflächenanalytik zeigt sich kein direkter Zusammenhang zwischen der spezifischen Extraktoberfläche (BET) und der Fähigkeit zur Gelbildung. Generell liegt die spezifische Oberfläche von SCF-Extrakten zwischen  $15 \text{ m}^2/\text{g}$  und  $70 \text{ m}^2/\text{g}$  und im Durchschnitt etwas höher als die Oberfläche der LM-Referenz ( $29 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Die dispersiven Oberflächenenergien von SCF-Extrakten und LM-Extrakten unterscheidet sich zwar, allerdings besteht auch hier keine Korrelation zur Gelstärke.

Infrarotspektren von SCF-Extrakt stabilisierten Gelen zeigen teilweise nur geringe OH-Absorptionsbanden bei hoher Gelstärke. Dies spricht dafür, dass neben der in der Literatur diskutierten Stabilisierung über Wasserstoffbrückenbindungen noch andere Effekte an der Gelbildung beteiligt sind.

## 6 Literaturverzeichnis

- [1] **Apothekerverbände, ABDA – Bundesvereinigung Deutscher, (2015)**  
Die Apotheke – Zahlen, Daten, Fakten 2015.
- [2] **Grysko, M., (2011)**  
Herstellung und Charakterisierung von halbfesten Systemen auf Basis von Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork,  
Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Eberhard Karls Universität Tübingen.
- [3] **Laszczyk, M., (2007)**  
Triterpentrockenextrakt aus Birkenkork (*Betula alba cortex*), Untersuchungen zur chemischen Zusammensetzung, Galenik, Penetration und pharmakologisch-biologischen Wirkung,  
Dissertation, Fakultät für Biologie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau.
- [4] **Scheffler, A., (2003)**  
Emulsion containing a plant extract, method for producing said emulsion and for obtaining a plant extract,  
US2003/0087789 A1.
- [5] **Wu, Q; Li, H.; Qiu, J.; Feng, H., (2014)**  
Betulin protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury,  
*Microbial Pathogenesis* 75:21-28.
- [6] **Huyke, C.; Reuter, J.; Rödig, M.; Kersten, A.; Laszczyk, M.; Scheffler, A.; Nashan, D.; Schempp, C., (2009)**  
Treatment of actinic keratoses with a novel betulin-based oleogel. A prospective, randomized, comparative pilot study,  
*Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 7:128-134.
- [7] **Ebeling, S.; Naumann, K.; Pollok, S.; Wardecki, T.; Vidal-y-Sy, S.; Nascimento, J.M.; Boerries, M.; Schmidt, G.; Brandner, J.M.; Merfort, I., (2014)**  
From a Traditional Medicinal Plant to a Rational Drug: Understanding the Clinically Proven Wound Healing Efficacy of Birch Bark Extract,  
*Plos One* 9(1):e86147.
- [8] **Metelmann, HR.; Fimmers, R.; Böttger, K.; Brandner, J.M.; Scheffler, A.; Schumann, H.; Podmelle, F., (2015)**  
Accelerated Reepithelialization by Triterpenes: Proof of Concept in the Healing of Surgical Skin Lesions,  
*Skin Pharmacology and Physiology* 28:1-11.
- [9] **Krasutsky, P.A.; Carlson, R.M.; Nesterenko, V.V.; Kolomitsyn, I.M.; Edwardsoll, C.F., (2003)**  
Birch bark processing and the isolation of natural products from birch bark,  
US 6,634,575 B2.
- [10] **Sarek, J.; Svoboda, M.; Hajdich, M., (2009)**  
Method of preparation and isolation of betulin diacetate from birch bark from paper mills and its optional processing to betulin,  
US 2009/0318719 A1.

- [11] **Wischumerski, R. S., M. Turk, and M. A. Wahl, (2008)**  
Direct drug loading into preformed porous solid dosage units by the controlled particle deposition (CPD), a new concept for improved dissolution using SCF-technology,  
J Pharm Sci 97(10):4416-4423.
- [12] **Martin, J.-H., (2003)**  
Charakterisierung von schwerlöslichen Arzneistoff-Nanopartikeln hergestellt durch das RESS-Verfahren zur Verbesserung der Bioverfügbarkeit,  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- [13] **Debenedetti, P.G., (1990)**  
Homogeneous Nucleation in Supercritical Fluids,  
AIChE Journal 36(9):1289-1298.
- [14] **Jung, J.; Perrut, M., (2001)**  
Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey,  
Journal of Supercritical Fluids 20:179-219.
- [15] **Zhang, YH.; Yu, T.; Wang, Y., (2003)**  
Extraction of betulin from bark of *Betula platyphylla* by supercritical carbon dioxide extraction,  
Journal of Forestry Research 14(3):202-204.
- [16] **Grünberg, J., (2002)**  
Middle Palaeolithic birch-bark pitch,  
Antiquity 76:15-16.
- [17] **Spindler, K., (1994)**  
The Man in the Ice,  
Harmony Books, New York, 113.
- [18] **Adney, E.T.; Chapelle, H., (2007)**  
Bark Canoes and Skin Boats of North America,  
Skyhorse Publishing Inc.
- [19] **Hayek, E.W.H.; Jordis, U.; Moche, W.; Sauter, F., (1989)**  
A bicentennial of betulin,  
Phytochemistry 28(9):2229-2242.
- [20] **Major, H., (2002)**  
Untersuchungen zur Wirkungsweise von Birkenblättern (*Betulae folium*) und phenolischer Verbindungen – unter besonderer Berücksichtigung der Beeinflussung von Metallopeptidasen,  
Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.
- [21] **Härtel, Breitkopf;, (1834)**  
Hauslexikon,  
Band 1, Leipzig 1834, 610 f.
- [22] **Krasutsky, P.A., (2006)**  
Birch bark research and development,  
The Royal Society of Chemistry: Natural Product Reports 23:919-942.
- [23] **Lowitz, J.T., (1788)**  
Über eine neue, fast benzoeartige Substanz der Birken,  
Crell's Chem. Ann. 1:312-317.
- [24] **Hess, H., (1839)**  
Untersuchung über die Zusammensetzung der Harze,  
Annalen der Physik 122(2):319-326.
- [25] **Hausmann, U., (1876)**  
Beiträge zur Kenntniss des Betulins,  
Justus Liebig's Annalen der Chemie 182(3):368-380.

- [26] **Brüngger, H., (1932)**  
Über das Betulin,  
Dissertation, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- [27] **Hejno, K.; Jarolim, V.; Sorm, F., (1965)**  
Über einige Inhaltsstoffe des weissen Teils der Birkenrinde,  
Collect. Czech. Chem. Commun. 30(4):1009-1015.
- [28] **Jeger, O., (1959)**  
Über die Konstitution der Triterpene,  
Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe 7.
- [29] **Gong, Y.; Raj, K.M.; Luscombe, C.A.; Gadawski, I.; Tam, T.; Chu, J.; Gibson, D.; Carlson, R.; Sacks, S.L., (2004)**  
The synergistic effects of betulin with acyclovir against herpes simplex viruses,  
Antiviral Research 64:127-130.
- [30] **Suksamrarn, S.; Panseeta, P.; Kunchanawatta, S.; Distaporn, T.; Ruktasing, S.; Suksamrarn, A., (2006)**  
Ceanothane- and Lupane-Type Triterpenes with Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities from *Ziziphus cambodiana*,  
Chem. Pharm. Bull. 54(4):535-537.
- [31] **Ndjakou Lenta, B.; Ngouela, S.; Fekam Boyom, F.; Tantangmo, F.; Feuya Tchouya, G.R.; Tsamo, E.; Gut, J.; Rosenthal, P.J.; Conolly, J.D., (2007)**  
Anti-plasmodial Activity of Some Constituents of the Root Bark of *Harungana madagascariensis* LAM. (Hypericaceae),  
Chem. Pharm. Bull. 55(3):464-467.
- [32] **Aiken, C.; Chen, C.H., (2005)**  
Betulinic acid derivatives as HIV-1 antivirals,  
Trends in Molecular Medicine 11(1):31-36.
- [33] **Reyes, C.P.; Nunez, M.J.; Jimenez, I.A.; Busserolles, J.; Alcaraz, M.J.; Bazzocchi, I.L., (2006)**  
Activity of lupane triterpenoids from *Maytenus* species as inhibitors of nitric oxide and prostaglandin E2,  
Bioorganic & Medicinal Chemistry 14:1573–1579.
- [34] **Pavlova, N.I.; Savinova, O.V.; Nikolaeva, S.N.; Boreko, E.I.; Flekhter, O.B., (2003)**  
Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses,  
Fitoterapia 74:489-492.
- [35] **Gu, J.Q.; Wang, Y.; Franzblau, S.G.; Montenegro, G.; Yang, D.; Timmermann, B.N., (2004)**  
Antitubercular Constituents of *Valeriana laxiflora*,  
Planta Med 70:509-514.
- [36] **Shai, L.J.; McGaw, L.J.; Aderogba, M.A.; Mdee, L.K.; Eloff, J.N., (2008)**  
Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves,  
Journal of Ethnopharmacology 119:238-244.
- [37] **Fontanay, S.; Grare, M.; Mayer, J.; Finance, C.; Duval, R. E., (2008)**  
Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes,  
Journal of Ethnopharmacology 120:272–276.
- [38] **Oh, S.H.; Choi, J.E.; Lim, S.C., (2006)**  
Protection of betulin against cadmium-induced apoptosis in hepatoma cells,  
Toxicology 220:1-12.

- [39] **Szuster-Ciesielska, A.; Kandefer-Szerszen, M., (2005)**  
Protective effects of betulin and betulinic acid against ethanol-induced cytotoxicity in HepG2 cells,  
Pharmacological Reports 57:588-595.
- [40] **Wang, X.; Ye, XL. ; Liu, R.; Chen, HL.; Bai, H.; Liang, X.; Zhang, XD.; Wang, Z.; Li, WL.; Hai, CX., (2010)**  
Antioxidant activities of oleanolic acid in vitro: Possible role of Nrf2 and MAP kinases,  
Chemico-Biological Interactions 184:328–337.
- [41] **Pollier, J.; Goossens, A., (2012)**  
Oleanolic acid,  
Phytochemistry 77:10-15.
- [42] **Liu, J., (2005)**  
Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives,  
Journal of Ethnopharmacology 100:92–94.
- [43] **Kim, KA.; Lee, JS.; Park, HJ.; Kim, JW.; Kim, CJ.; Shim, IS.; Kim, NJ.; Han, SM.; Lim, S., (2004)**  
Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes,  
Life Sciences 74:2769–2779.
- [44] **Kim, SJ.; Cho, HI.; Kim, SJ.; Kim, JS.; Kwak, JH.; Lee, DU.; Lee, S.K.; Lee, SM., (2014)**  
Protective Effects of Lupeol against D-Galactosamine and Lipopolysaccharide-Induced Fulminant Hepatic Failure in Mice,  
Journal of Natural Products 77:2383–2388.
- [45] **Yi, J.; Xia, W.; Wu, J.; Yuan, L.; Wu, J.; Tu, D.; Fang, J.; Tan, Z., (2014)**  
Betulinic acid prevents alcohol-induced liver damage by improving the antioxidant system in mice,  
Journal of Veterinary Science 15(1):141-148.
- [46] **Tanaka, R.; Kinouchi, Y.; Wada, S.; Tokuda, H., (2004)**  
Potential anti-tumor promoting activity of lupanetype triterpenoids from the stem bark of *Glochidion zeylanicum* and *Phyllanthus flexuosus*,  
Planta Med 70:1234-1236.
- [47] **Soica, C.; Dehelean, C.; Danciu, C.; Wang, H.M.; Wenz, G.; Ambrus, R.; Bojin, F.; Anghel, M., (2012)**  
Betulin Complex in  $\gamma$ -Cyclodextrin Derivatives: Properties and Antineoplastic Activities in In Vitro and In Vivo Tumor Models,  
International Journal of Molecular Sciences 13:14992-15011.
- [48] **Fulda, S.; Kroemer, G., (2009)**  
Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers,  
Drug Discovery Today 14:885-890.
- [49] **Kessler, J.H.; Mullauer, F.B.; de Roo, G.M.; Medema, J.P., (2007)**  
Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types,  
Cancer Letters 251:132-145.
- [50] **Kommerer, H.; Kaluderović, G.N.; Kalbitz, J.; Paschke, R., (2011)**  
Lupane Triterpenoids—Betulin and Betulinic acid derivatives induce apoptosis in tumor cells,  
Investigational New Drugs 29:266–272.

- [51] **Drag-Zalesinska, M.; Wysockaa, T.; Borska, S.; Drag, M.; Poreba, M.; Choromanska, A.; Kulbacka, J.; Saczko, J., (2015)**  
The new esters derivatives of betulin and betulinic acid in epidermoid squamous carcinoma treatment – In vitro studies,  
Biomedicine & Pharmacotherapy 72:91-97.
- [52] **Liu, Y.; Bi, T.; Wang, G.; Dai, W.; Wu, G.; Qian, L.; Gao, Q.; Shen, G., (2015)**  
Lupeol inhibits proliferation and induces apoptosis of human pancreatic cancer PCNA-1 cells through AKT/ERK pathways,  
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 388:295–304.
- [53] **Wei, J.; Liu, M.; Liu, H.; Wang, H.; Wang, F.; Zhang, Y.; Hana, L.; Lin, X., (2013)**  
Oleanolic acid arrests cell cycle and induces apoptosis via ROS-mediated mitochondrial depolarization and lysosomal membrane permeabilization in human pancreatic cancer cells,  
Journal of Applied Toxicology 33:756–765.
- [54] **Galgon, T.; Wohlrab, W.; Dräger, B., (2005)**  
Betulinic acid induces apoptosis in skin cancer cells and differentiation in normal human keratinocytes,  
Experimental Dermatology 14:736-743.
- [55] **Lee, K.H.; Nam, G.W.; Kim, S.H.; Lee, S.H., (2006)**  
Phytocomponents of triterpenoids, oleanolic acid and ursolic acid, regulated differently the processing of epidermal keratinocytes via PPAR- $\alpha$  pathway,  
Experimental Dermatology 15:66-73.
- [56] **Moura-Letts, G.; Villegas, L.F.; Marcalo, A.; Vaisberg, A.J.; Hammond, G.B., (2006)**  
In vivo wound-healing activity of oleanolic acid derived from the acid hydrolysis of *Anredera diffusa*,  
Journal of Natural Products 69:978-979.
- [57] **Zhang, SY.; Zhao, QF.; Fang, NN.; Yu, JG., (2015)**  
Betulin inhibits pro-inflammatory cytokines expression through activation STAT3 signaling pathway in human cardiac cells,  
European Review for Medical and Pharmacological Sciences 19:455-460.
- [58] **Bani, S.; Kaul, A.; Khan, B.; Ahmad, S.F.; Suri, K.A.; Gupta, B.D.; Satti, N.K.; Qazi, G.N., (2006)**  
Suppression of T Lymphocyte Activity by Lupeol Isolated from *Crataeva religiosa*,  
Phytotherapy Research 20:279-287.
- [59] **Fernandez, M.A.; de las Heras, B.; Garcia, M.D.; Saenz, M.T.; Villar, A., (2001)**  
New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol,  
Journal of Pharmacy and Pharmacology 53:1533-1539.
- [60] **Altinier, G.; Sosa, S.; Aquino, R.P.; Mencherini, T.; Della Loggia, R.; Tubaro, A., (2007)**  
Characterization of topical antiinflammatory compounds in *Rosmarinus officinalis*,  
Journal of Agricultural and Food Chemistry 55:1718-1723.
- [61] **Laszczyk, M.; Jäger, S.; Simon-Haarhaus, B.; Scheffler, A.; Schempp, C.M., (2006)**  
Physical, Chemical and Pharmacological Characterization of a New Oleogel-Forming Triterpene Extract from the Outer Bark of Birch (*Betulae Cortex*),  
Planta Med 72:1389-1395.

- [62] **Guidoina, MF.; Yanga, J.; Pichette, A.; Roy, C., (2003)**  
Betulin isolation from birch bark by vacuum and atmospheric sublimation. A thermogravimetric study,  
Thermochimica Acta 398:153-166.
- [63] **Chen, QH.; Fu, ML.; Liu, J.; Zhang, HF.; He, GQ.; Ruan, H., (2009)**  
Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of betulin from white birch bark using response surface methodology,  
Ultrasonics Sonochemistry 16:599-604.
- [64] **de la Tour, C., (1822)**  
Exposé de quelques résultats obtenus par l'action combinée de la chaleur et de la compression sur certains liquides, tels que l'eau, l'alcool, l'éther sulfuric et l'essence de pétrol rectifiée,  
Ann. chim. phys. 21:127-132, 178-182.
- [65] **Andrews, T., (1869)**  
The Bakerian Lecture: On the Continuity of the Gaseous and Liquid States of Matter,  
Philosophical Transactions of the Royal Society of London A159:575-590.
- [66] **van der Waals, J.D., (1873)**  
The continuity of the liquid and gaseous states,  
Dissertation, Universität Leiden.
- [67] **Hannay, J.B.; Hogarth, J., (1879)**  
On the solubility of solids in gases,  
Proc. Roy. Soc. 29:324-326.
- [68] **Tyrer, D., (1910)**  
Solubilities below and above the critical temperature,  
J. Chem. Soc. 97:621-632.
- [69] **Zosel, K., (1970)**  
Verfahren zur Entcoffeinierung von Kaffee,  
Ger. Offen. DE 2 005 293.
- [70] **Vizthum, O.; Hubert, P., (1971)**  
Verfahren zur Herstellung von Hopfenextrakten,  
Ger. DE 2 127 618.
- [71] **Stahl, E.; Quirin, K.-W.; Gerard, D., (1987)**  
Verdichtete Gase zur Extraktion und Raffination,  
Springer Berlin, 1-260.
- [72] **Modey, W. K.; Mulholland, D. A.; Raynor, M. W., (1996)**  
Analytical supercritical fluid extraction of natural products,  
Phytochem. Anal. 7:1-15.
- [73] **Kaiser, C. S.; Römpf, H.; Schmidt, P. C., (2001)**  
Pharmaceutical applications of supercritical carbon dioxide,  
Pharmazie 56:907-926.
- [74] **Klesper, E.; Corwin, A. H.; Turner, D. A., (1968)**  
High pressure gas chromatography above critical temperatures,  
J. Org. Chem. 27:700-701.
- [75] **Hawthorne, S. B., (1990)**  
Analytical-scale supercritical fluid extraction,  
Anal. Chem. 62:633-642.
- [76] **Guiochon, G.; Tarafder, A., (2011)**  
Fundamental challenges and opportunities for preparative supercritical fluid chromatography,  
Journal of Chromatography A 1218(8):1037-1114.



- [77] **Savage, P. E., (1999)**  
Organic Chemical Reactions in Supercritical Water,  
Chemical Review 99:603-621.
- [78] **Perrut, M.; Jung, J.; Leboeuf, F.; Fabing, I., (2002)**  
Procédé de fabrication de complexes hôtes-client,  
Patent WO 02/089851.
- [79] **Perrut, M., (2003)**  
Supercritical fluids applications in the pharmaceutical industry,  
STP Pharm. Sci. 13:83-91.
- [80] **Perrut, M.; Jung, J.; Leboeuf, F., (2005)**  
Enhancement of dissolution rate of poorly-soluble active ingredients by  
supercritical fluid processes; Part I: Micronization of neat particles,  
Int. J. Pharm. 288:3-10.
- [81] **Müllers, K.C.; Paisana, M.; Wahl, M.A., (2015)**  
Simultaneous Formation and Micronization of Pharmaceutical Cocrystals by  
Rapid Expansion of Supercritical Solutions (RESS),  
Pharmaceutical Research 32(2):702-713.
- [82] **Wahl, M. A., (2009)**  
Supercritical Fluid Technology; In: Dilip M. Parikh (ed). Handbook of  
Pharmaceutical Granulation,  
Informa Healthcare, New York, London.
- [83] **White, A.; Burns, D.; Christensen, T.W., (2006)**  
Effective terminal sterilization using supercritical carbon dioxide,  
Journal of Biotechnology 123(4):504-515.
- [84] **Goldfarb, D.L.; de Pablo, J.J.; Nealey, P.F.; Simons, J.P.; Moreau, W.M.;  
Angelopoulos, M., (2000)**  
Aqueous-based photoresist drying using supercritical carbon dioxide to prevent  
pattern collapse,  
J. Vac. Sci. Technol. B 18:3313.
- [85] **Tang, Q.; Wang, T., (2005)**  
Preparation of silica aerogel from rice hull ash by supercritical carbon dioxide  
drying,  
The Journal of Supercritical Fluids 35(1):91-94.
- [86] **Latscha, H.P.; Schilling, G.; Klein, H.A., (1993)**  
Chemie-Datensammlung 2. Auflage,  
Springer Verlag.
- [87] **Moriyoshi, T.; Kita, T.; Uosaki, Y., (1993)**  
Static relative permittivity of carbon dioxide and nitrous oxide up to 30 MPa,  
Ber. Bunsenges. Phys. Chem. 97:589-596.
- [88] **Sen, A.D.; Anicich, V.G.; Arakelian, T., (1992)**  
Dielectric constant of liquid alkanes and hydrocarbon mixtures,  
J. Phys. D: Appl. Phys. 25:516-521.
- [89] **von Hippel, A., (1995)**  
Dielectric Materials and Applications,  
Technology Press, Boston MA.
- [90] **Reverchon, E.; Adami, R., (2006)**  
Nanomaterials and supercritical fluid,  
Journal of Supercritical Fluids 37:1-22.

- [91] **Matson, D.W.; Fulton, J.L.; Petersen, R.C.; Smith, R.D., (1987)**  
Rapid Expansion of Supercritical Fluid Solutions: Solute Formation of Powders, Thin Films, and Fibers,  
Industrial & Engineering Chemistry Research 26:2298-2306.
- [92] **Petersen, R.C.; Matson, D.W.; Smith, R.D., (1986)**  
Rapid Precipitation of Low Vapor Pressure Solids from Supercritical Fluid Solutions: The Formation of Thin Films and Powders,  
American Chemical Society 108(8):2100-2102.
- [93] **Müllers, K.C., (2015)**  
Crystal Engineering and Particle Design of Poorly Soluble Drugs via Rapid Expansion of Supercritical Solutions,  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- [94] **Young, T.J.; Mawson, S.; Johnston, K.P.; Henriksen, I.B.; Pace, G.W.; Mishra, A.K., (2000)**  
Rapid expansion from supercritical to aqueous solution to produce submicron suspensions of water-insoluble drugs,  
Biotechnology Progress 16:402-407.
- [95] **Steckel, H.; Müller, B.W., (1998)**  
Metered-dose inhaler formulation of fluticasone-17-propionate micronized with supercritical carbon dioxide using the alternative propellant HFA-227,  
Int. J. Pharm. 173:25-33.
- [96] **Joule, J.P.; Thompson, W., (1852)**  
On the thermal effects experienced by air in rushing through small apertures,  
Philosophical Magazine 4(284):481-492.
- [97] **Pickering, S. U., (1907)**  
CXCVI.-Emulsions,  
Journal of the Chemical Society, Transactions 91(0):2001-2021.
- [98] **Geiger, K., (1988)**  
Weissenberg-Rabinowitsch-Auswertung der mit dem Platte-Platte-Rotationsrheometer gemessenen Fließkurve mittels eines Fließgesetzes vom Carreauschen Typ,  
Rheologica Acta 27(2):209-211.
- [99] **Hochstein, B.; Brummer, R., (2012)**  
Rheologische Grundlagen und Relevanz in der kosmetischen Industrie, In: Emulgiertechnik,  
Behr's Verlag Hamburg.
- [100] **Brunauer, S.; Emmett, P.H.; Teller, E., (1938)**  
Adsorption of Gases in Multimolecular Layers,  
Contribution from the Bureau of Chemistry and Soils and George Washington University.
- [101] **Lowell, S.; Shields, J.E.; Thomas, M.A.; Thommes, M., (2004)**  
Characterization of Porous Materials and Powders: Surface Area, Pore Size and Density,  
Springer Verlag.
- [102] **Fowkes, F.M.; , (1964)**  
Attractive Forces at Interfaces,  
Industrial and Engineering Chemistry 56(12):40-52.
- [103] **Kaelble, D.H., (1970)**  
Dispersion-Polar Surface Tension Properties of Organic Solids,  
Journal of Adhesion 2:66-81.

- [104] **Owens, D.; Wendt, R., (1969)**  
Estimation of the Surface Free Energy of Polymers,  
Journal of Applied Polymer Science 13:1741-1747.
- [105] **Rabel, W., (1971)**  
Einige Aspekte der Benetzungstheorie und ihre Anwendung auf die  
Untersuchung und Veränderung der Oberflächeneigenschaften von Polymeren,  
Farbe und Lack 77(10):997-1005.
- [106] **Wu, S., (1971)**  
Calculation of Interfacial Tensions in Polymer Systems,  
Journal of Polymer Science 43:19-30.
- [107] **Good, R.J.; van Oss, C.J., (1992)**  
The Modern Theory of Contact Angles and the Hydrogen bond Components of  
Surface Energies, In: Modern approaches to wettability,  
Loeb, G.I.; Schrader, M.E., 1-27.
- [108] **Washburn, E.W., (1921)**  
The dynamics of capillary flow,  
Physical Review 17:374.
- [109] **Kiselev, AV.; Yashin, YI.; Bradley, J., (1969)**  
Gas-adsorption chromatography,  
New York Plenum Press.
- [110] **Mohammadi-Jam, S.; Waters, K.E., (2014)**  
Inverse gas chromatography applications: A review,  
Advances in Colloid and Interface Science 212:21-44.
- [111] **Schultz, J.; Lavielle, L.; Martin, C., (1987)**  
The role of the interface in carbon fibre-epoxy composites,  
Journal of Adhesion 23:45-60.
- [112] **Römpp, H., (2003)**  
Anreicherung und In-Line-Einschluss von Hyperforin aus Hypericum  
Perforatum L. mittels überkritischer CO<sub>2</sub>-Extraktion,  
Dissertation, Eberhard-Karls-Universität Tübingen.
- [113] **Stank, K., (2014)**  
Oberflächenmodifizierung von Wirkstoffen zur Inhalation,  
Dissertation, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

## 7 Anhang

### 7.1 Daten zur Kalibrierung der HPLC-Methode zur Bestimmung der Triterpenzusammensetzung von Birkenkorkextrakten

Für die Kalibrierung werden pro Substanz sechs äquidistante (acht bei BS) Konzentrationsniveaus innerhalb des Kalibrierbereichs festgelegt und bei jedem Kalibrierniveau sechs Proben vermessen. Die Spezifität wird über das Fehlen eines anderen Signals beim jeweiligen Peak und die unterschiedlichen Retentionszeiten nachgewiesen (Abbildung 51; Abbildung 52; Tabelle 17). Lediglich die Peaks von BS und OS überschneiden sich im unteren Drittel und werden daher manuell integriert. Isopropanol als Lösemittel eluiert innerhalb der ersten drei Minuten und stört die Triterpendetektion somit nicht. Die Beurteilung der Linearität erfolgt über das Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , die relative Verfahrensstandardabweichung (Formel 13) und die Residuen in y-Richtung (Tabelle 17). Als Maß für die Systempräzession dient die mittlere relative Standardabweichung bei Mehrfachmessungen. Dafür werden pro Konzentrationsniveau sechs Proben gleicher Konzentration vermessen, die jeweilige relative Standardabweichung berechnet und die relativen SD Werte gemittelt (Tabelle 17). Für die Beurteilung der Richtigkeit des Analysenverfahrens kann die mittlere Wiederfindung herangezogen werden (Tabelle 17). Zur Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze werden Formeln aus der ICH Guideline Q2(R1) herangezogen (Formel 14; Formel 15).

*Formel 11: Berechnung der Rest-SD  $S_y$ ;  $y_i$  = Signalwert,  $m$  = Steigung der Kalibriergeraden,  $x_i$  = Konzentrationswert,  $c$  = Achsenabschnitt der Kalibriergeraden,  $N$  = Anzahl Proben*

$$S_y = \sqrt{\frac{\sum [y_i - (m * x_i + c)]^2}{N - 2}}$$

*Formel 12: Berechnung der Verfahrensstandardabweichung  $S_{x0}$ ;  $S_y$  = Rest-SD,  $m$  = Steigung der Kalibriergeraden*

$$S_{x0} = \frac{S_y}{m}$$

Formel 13: Berechnung der relativen Verfahrensstandardabweichung  $V_{x0}$ ;  $S_{x0}$  = Verfahrens-SD,  $\bar{m}$  = mittlerer Kalibrierbereich

$$V_{x0} = \frac{S_{x0}}{\bar{m}} * 100$$

Formel 14: Berechnung der Bestimmungsgrenze nach ICH Q2(R1);  $S_{x0}$  = Verfahrens-SD

$$\text{Bestimmungsgrenze} = 3,3 * S_{x0}$$

Formel 15: Berechnung der Nachweisgrenze nach ICH Q2(R1);  $S_{x0}$  = Verfahrens-SD

$$\text{Nachweisgrenze} = 10 * S_{x0}$$

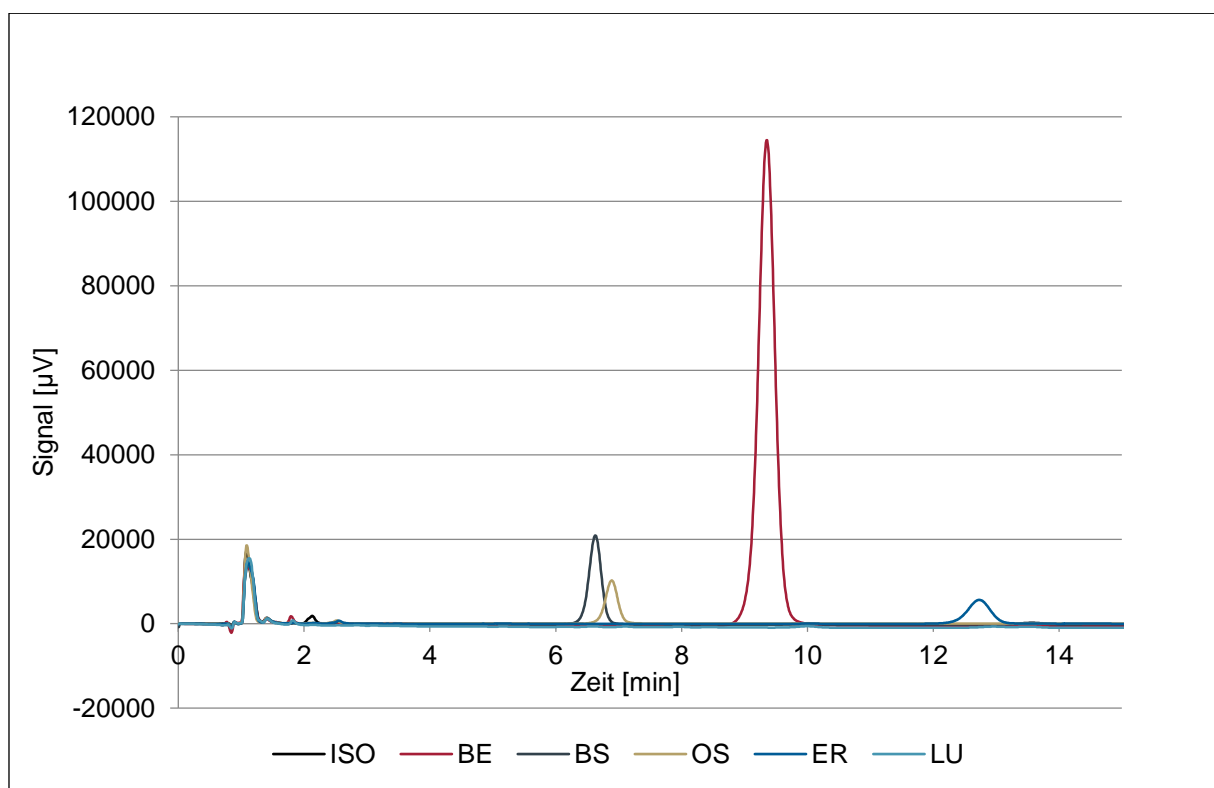


Abbildung 51: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol (1. Abschnitt; 0-15 min)

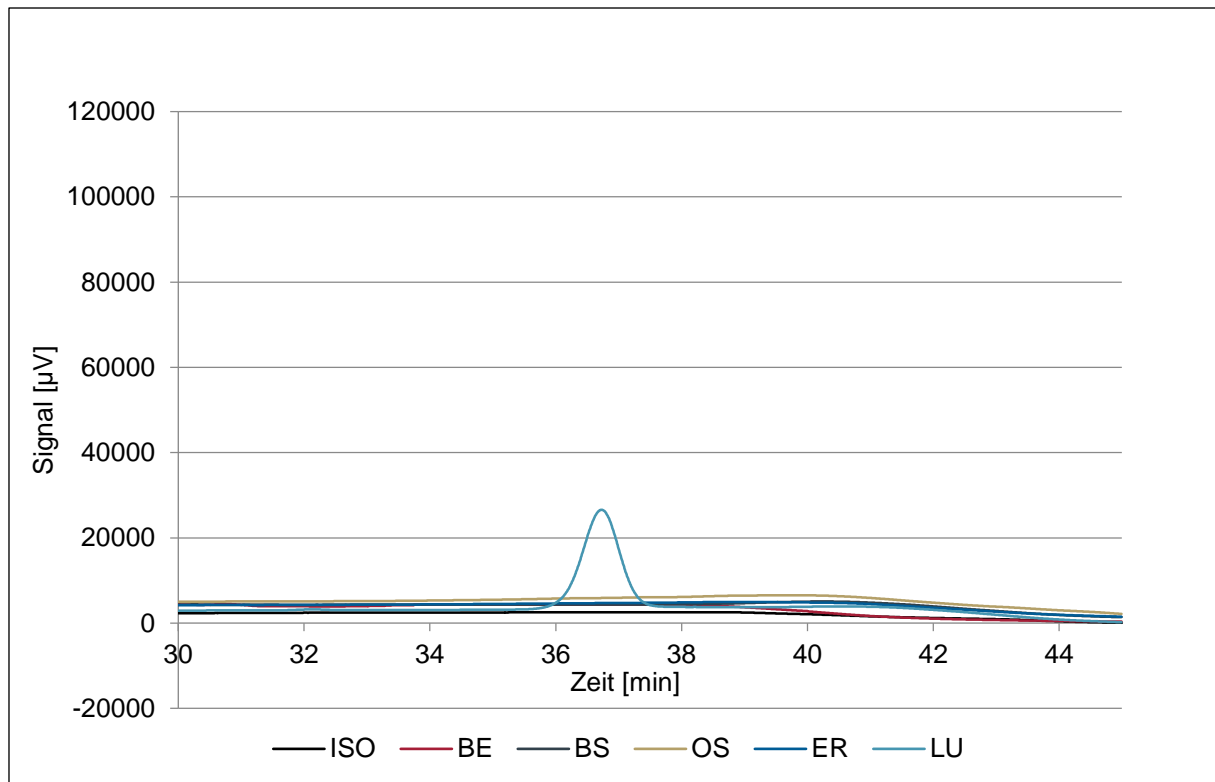


Abbildung 52: HPLC-Chromatogramm zur Trennung von Betulin, Betulinsäure, Oleanolsäure, Erythrodiol und Lupeol (2. Abschnitt; 30-45 min)

Tabelle 17: Validierungsparameter zur HPLC Analytik von Triterpenen

Kalibrierparameter	Betulin	Betulinsäure	Oleanolsäure	Erythrodiol	Lupeol
Konzentrationsbereich [mg/ml]	0,500 – 1,500	0,010 – 0,080	0,005 – 0,030	0,005 – 0,030	0,050 – 0,525
Kalibrierniveaus	6	8	6	6	6
Wiederholungen	6	6	6	6	6
Bestimmtheitsmaß ( $R^2$ )	0,9950	0,9997	0,9995	0,9997	0,9993
Steigung (m)	4523153	3820146	4945794	4903121	4535924
Achsenabschnitt (c)	-114642	-3214	-2158	-1257	-15117
Rest SD ( $S_y$ )	112603	1659	977	759	21357

Verfahrens-SD ( $S_{x0}$ )	0,0249	0,0004	0,0002	0,0002	0,0047
Relative Verfahrens-SD ( $V_{x0}$ ) [%]	2,49	0,97	1,13	0,89	1,71
Nachweiß- grenze [mg/ml]	0,082	0,001	0,001	0,001	0,016
Bestimmungs- grenze [mg/ml]	0,249	0,004	0,002	0,002	0,047
Mittlere Wiederfindung [%]	100,22 ± 2,28	100,35 ± 2,12	100,33 ± 1,91	100,33 ± 1,70	100,55 ± 5,75
Retentionszeit [min]	9,26 ± 0,04	6,59 ± 0,04	6,85 ± 0,03	12,66 ± 0,05	36,60 ± 0,17
Mittlere-relative SD [%]	0,16	0,43	0,53	0,66	2,74

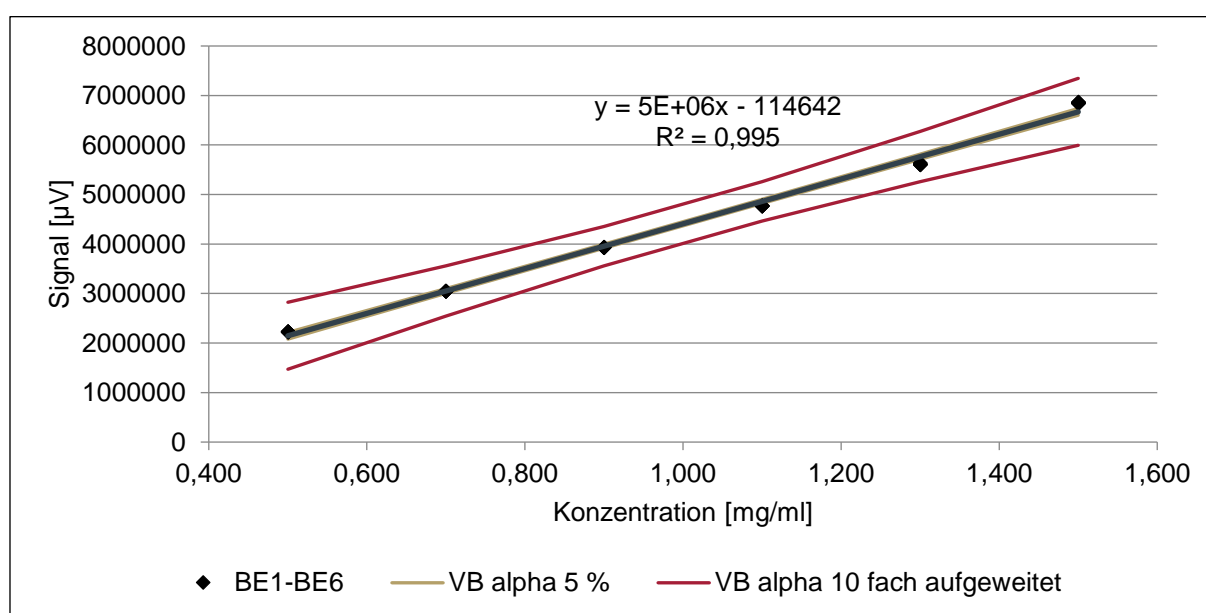


Abbildung 53: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Betulin

## 7 Anhang

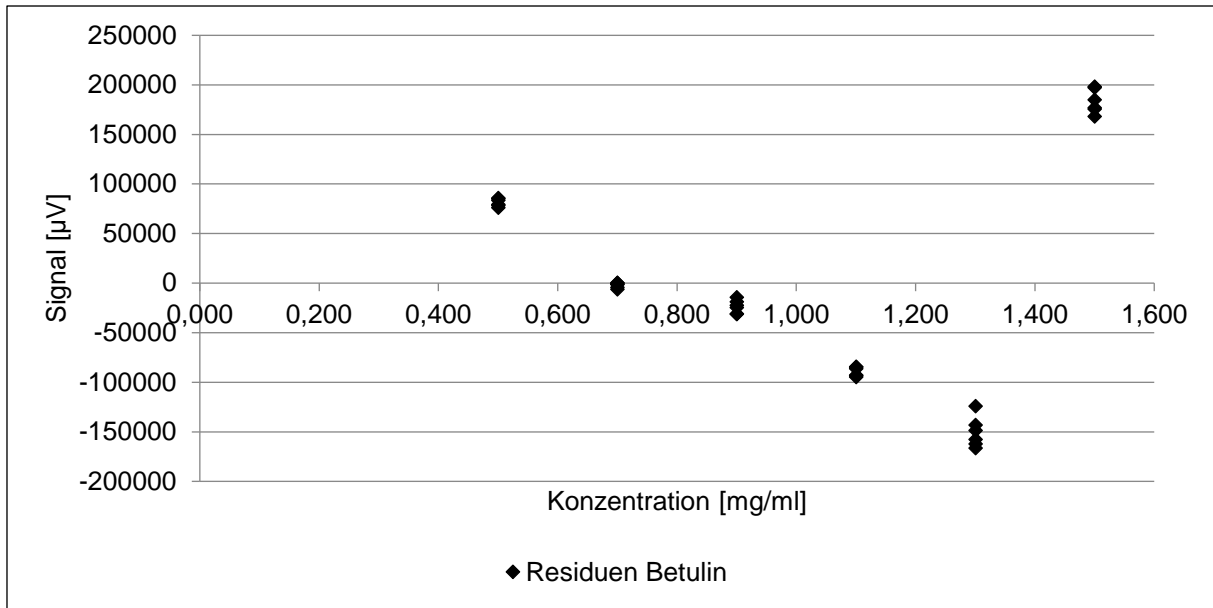


Abbildung 54: Residuenplot für die HPLC Analyse von Betulin

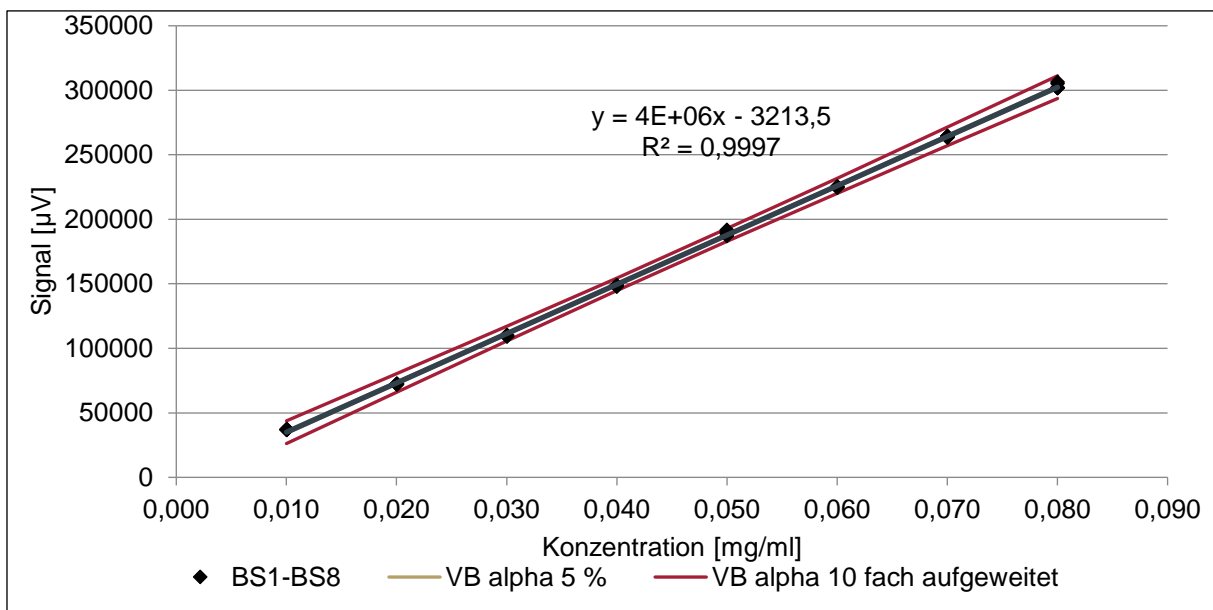


Abbildung 55: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Betulinsäure



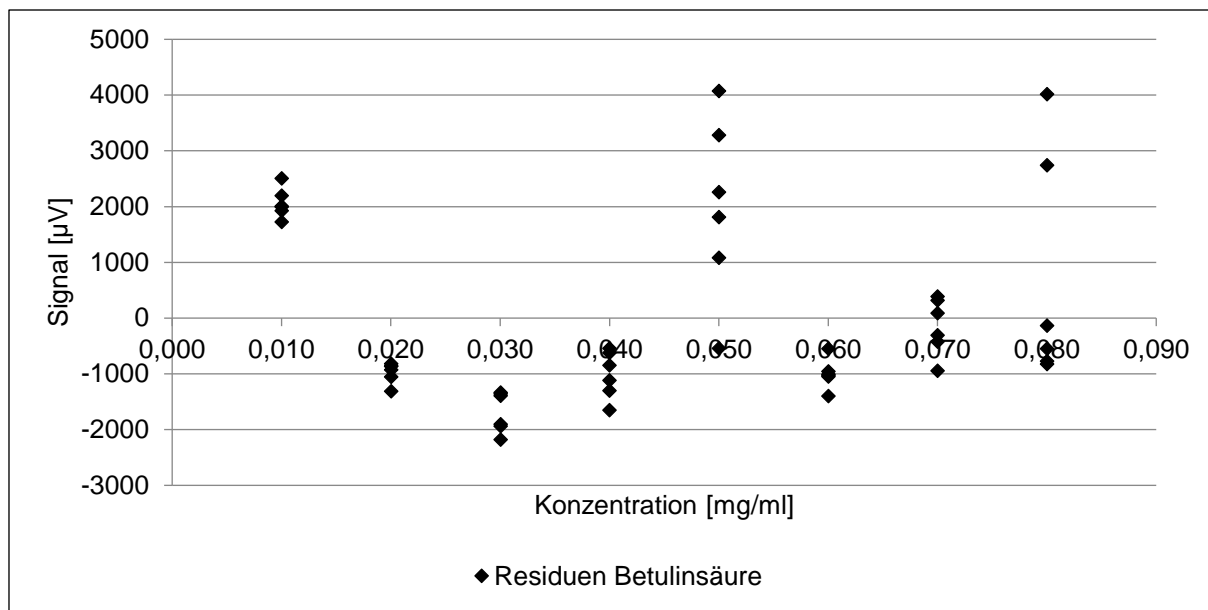


Abbildung 56: Residuenplot für die HPLC Analyse von Betulinsäure

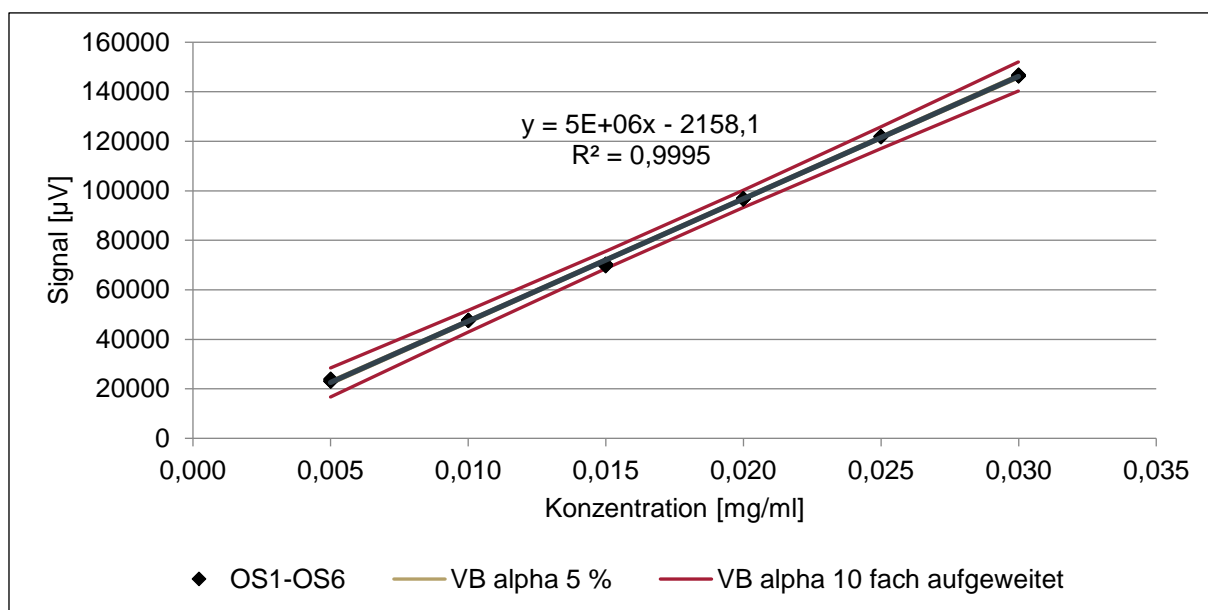


Abbildung 57: Kalibriergerade für die HPLC Analytik von Oleanolsäure

## 7 Anhang

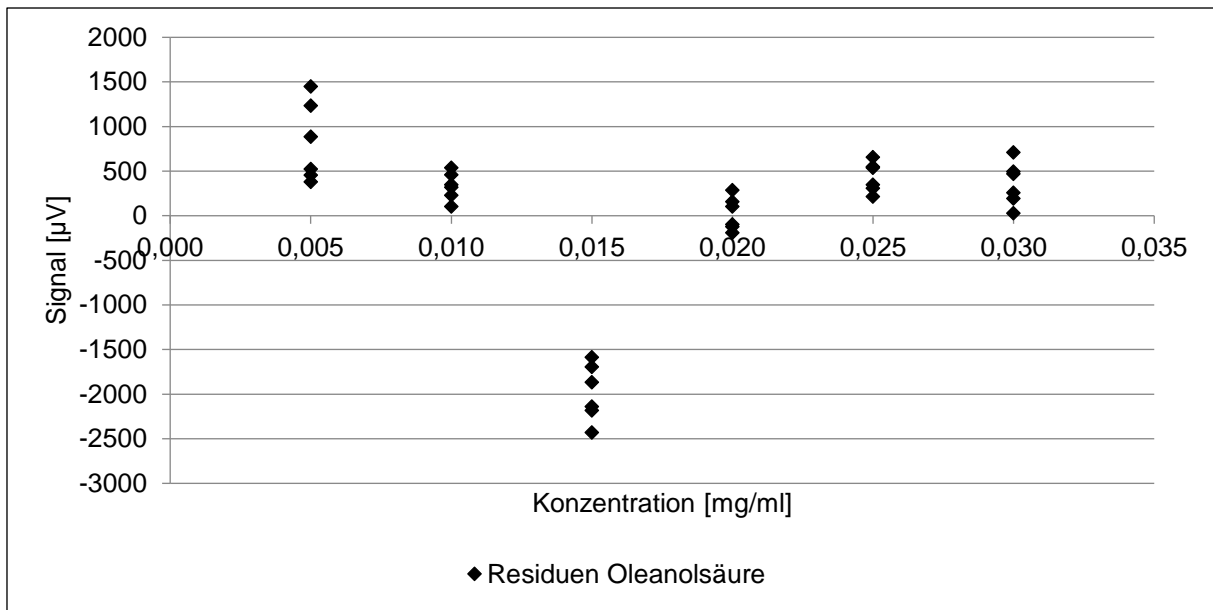


Abbildung 58: Residuenplot für die HPLC Analyse von Oleanolsäure

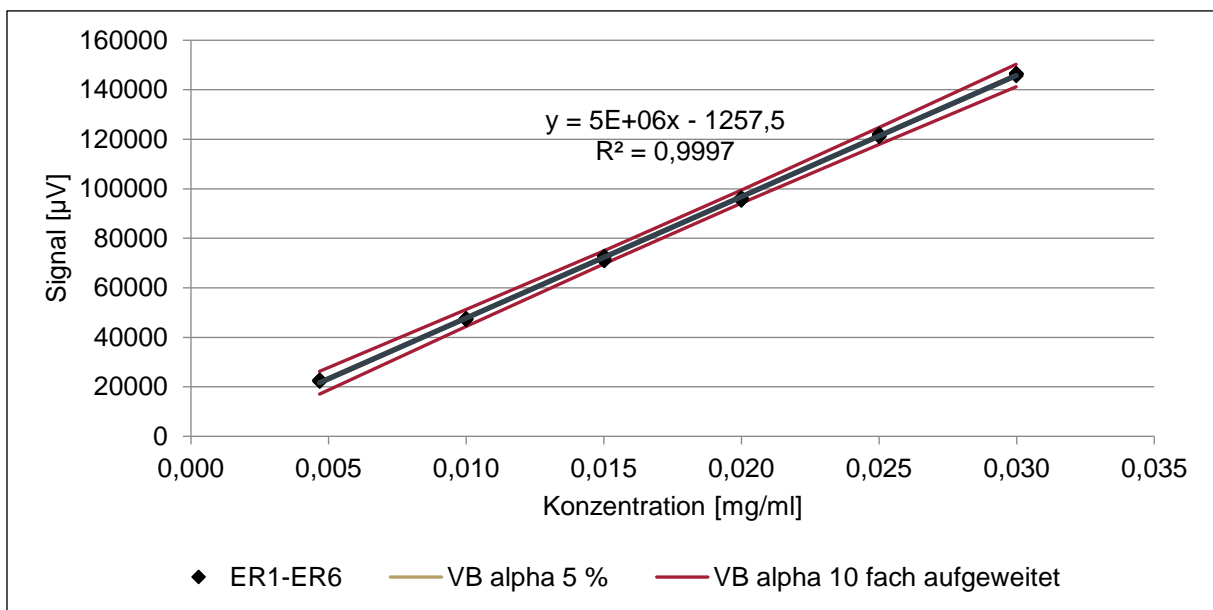


Abbildung 59: Kalibriergerade zur HPLC Analyse von Erythrodiol

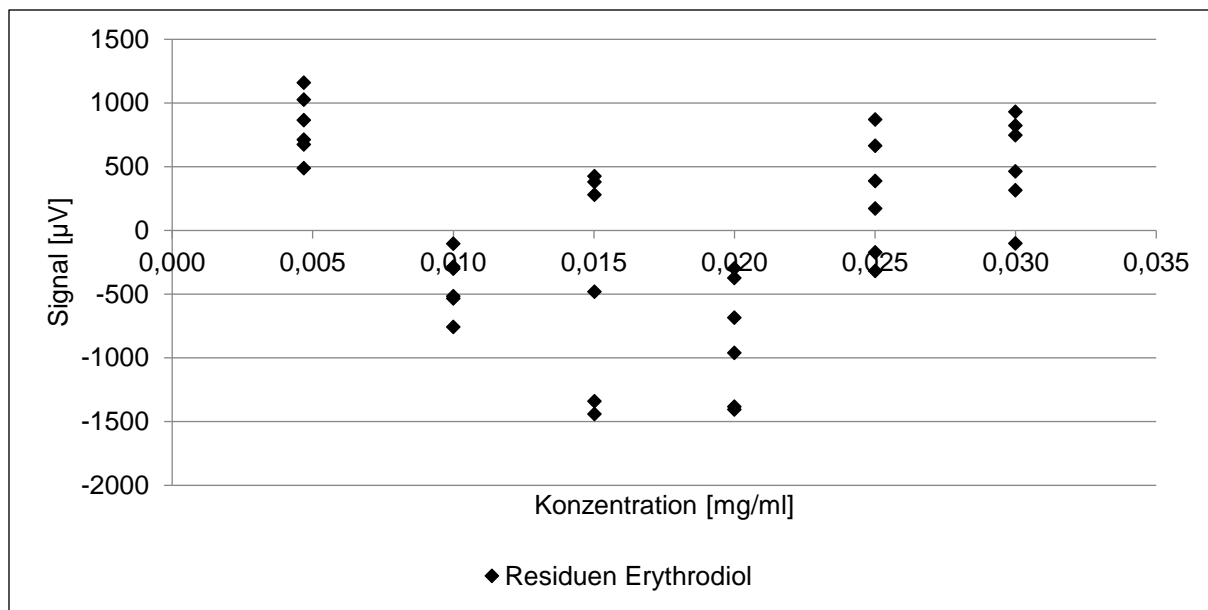


Abbildung 60: Residuenplot zur HPLC Analyse von Erythrodiol

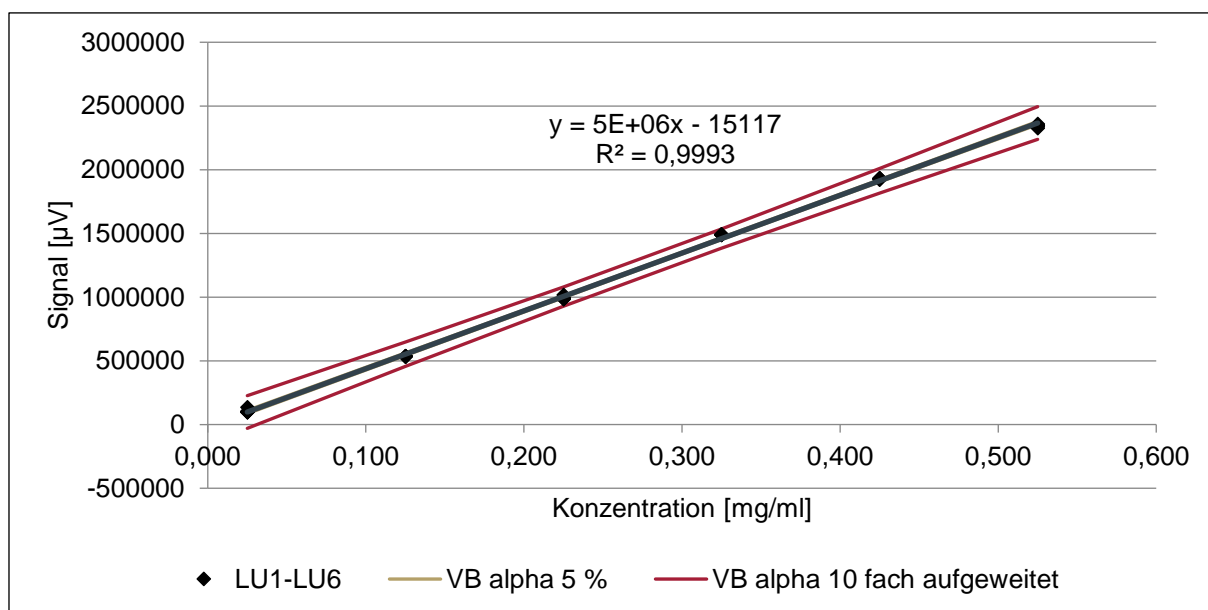


Abbildung 61: Kalibriergerade für die HPLC Analyse von Lupeol

## 7 Anhang

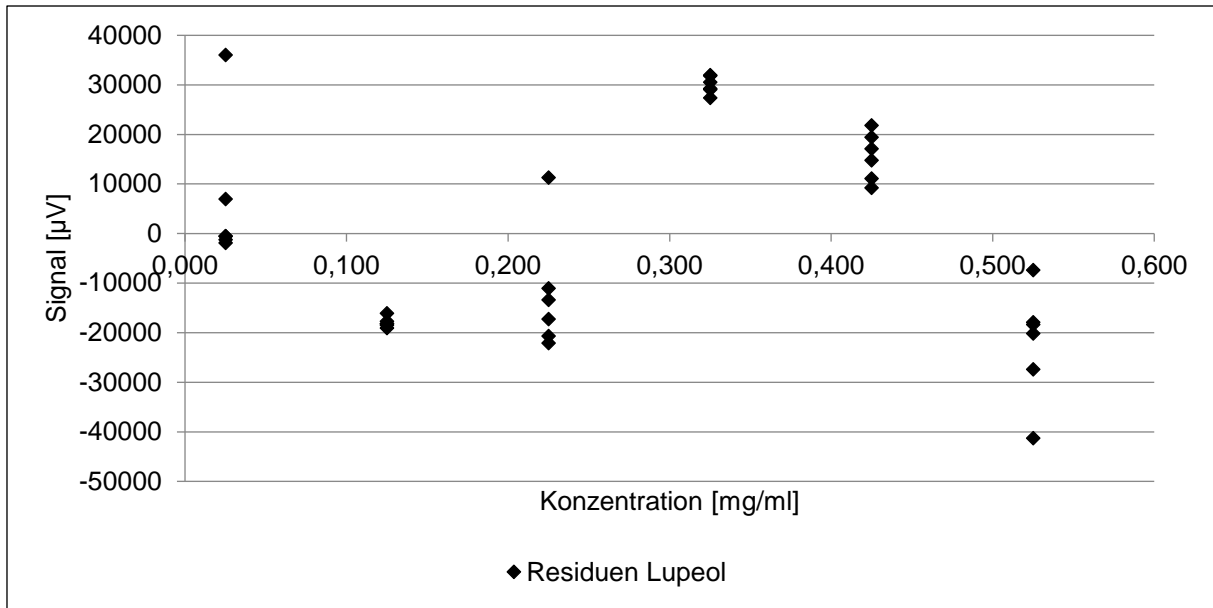


Abbildung 62: Residuenplot für die HPLC Analyse von Lupeol

## 7.2 Übersicht wichtiger Extraktionsparameter der einzelnen Chargen

Die folgenden Tabellen enthalten die wichtigsten Extraktionsparameter und Ergebnisse für Extrakte aus überkritischer Extraktion mit klassischer Partikelabscheidung (Tabelle 18) und RESS-Extraktion (Tabelle 19).

Abkürzungen:

p = Extraktionsdruck [bar];

T = Extraktionstemperatur [°C];

t = Extraktionszeit [h];

$\rho$  = mittlere CO<sub>2</sub>-Dichte [kg/m<sup>3</sup>];

MF = durchschnittlicher CO<sub>2</sub>-Massenfluss [kg/h];

BK = eingesetzte Masse Birkenkork [g];

A = Ausbeute absolut [g];

OF = spezifische BET Oberfläche [m<sup>2</sup>/g];

G' = Gelstärke (Speichermodul LVE) [Pa];

BE = Betulingehalt bezogen auf die Gesamtmasse des Extraktes [%];

LU = Lupeolgehalt bezogen auf die Gesamtmasse des Extraktes [%];

Po = Position der RESS-Düse (o = oben, u = unten);

pG = Gegendruck der Anlage bei RESS-Betrieb;

(F) = fraktionierte Extraktion;

(I) = Inkubation;

WB = Wasserbad in B6

Tabelle 18: Zusammenstellung wichtiger Extraktionsparameter und Extrakteigenschaften bei klassischer Partikelabscheidung im Separator

Extrakt	p	T	t	$\rho$	MF	BK	A	OF	G'	BE	LU
E10 (F)	350	60	3	850	14,5	50	2,75	-	-	61,3	18,0
E11	<b>100</b>	60	3	<b>325</b>	14,9	50	0	-	-	-	-
E12	<b>200</b>	60	3	<b>702</b>	14,7	50	0,56	-	-	-	-
E13 (F)	350	60	3	855	<b>5,1</b>	50	1,87	-	-	47,9	16,9
E14 (I)	350	60	3	850	13,3	50	2,40	-	-	48,9	19,4
E15	350	60	3	854	14,1	50	2,17	15,1	136	53,5	18,3
E16	350	60	3	849	13,7	50	3,49	37,3	2211	66,2	11,1
E17	350	60	3	850	13,2	50	2,09	76,1	5601	67,7	11,8
E18	350	60	-	852	13,6	50	2,05	16,2	6736	52,2	18,2

## 7 Anhang

E19	350	60	3	849	13,7	50	3,86	44,4	5333	67,0	12,2
E20	350	60	3	849	13,4	50	3,18	59,6	5286	69,8	12,3
E21	350	60	3	848	12,4	50	1,26	35,0	4339	65,5	13,2
E22	350	60	3	853	<b>5,2</b>	50	1,35	25,0	9922	58,1	15,9
E23	350	60	-	854	<b>5,0</b>	50	1,48	26,4	16297	51,9	20,1
E24	350	60	3	854	<b>5,1</b>	50	1,09	23,4	11327	56,3	16,7
E25	350	60	3	848	13,2	50	4,44	27,9	4486	68,1	12,1
E26	350	60	3	847	13,2	50	3,36	62,4	8864	74,7	10,0
E27	350	60	3	846	13,0	50	3,90	23,1	1425	68,9	13,0
E28	350	<b>40</b>	3	<b>926</b>	10,2	50	0,59	13,7	20844	49,1	23,5
E29	350	<b>40</b>	3	<b>925</b>	9,6	50	1,01	13,6	16717	53,8	20,7
E30 (I)	350	60	3	847	12,8	50	3,01	57,0	8572	73,4	11,8
E31	350	60	3	847	12,8	<b>200</b>	7,05	74,3	10367	54,2	26,1
E32	350	60	3	845	12,1	<b>100</b>	5,66	36,2	11082	61,9	18,0

Sämtliche RESS-Extraktionen werden mit 200 g Birkenkork durchgeführt und bei 350 bar und 60 °C für 3 h extrahiert.

*Tabelle 19: Zusammenstellung wichtiger Extraktionsparameter und Extrakteigenschaften bei RESS-Extraktion*

Extrakt	$\rho$	MF	A	OF	G'	BE	LU	Po	pG	WB
R1.1	896	1,49	1,66	2,4	13403	21,2	29,1	o	+	-
R1.2	895	1,47	1,00	7,7	21280	27,7	34,3	o	+	-
R1.3	891	1,46	0,60	12,5	45260	36,1	31,8	o	+	-
R1.4	886	1,54	0,45	29,0	29365	47,6	27,1	o	+	-
R1.5	885	1,57	0,39	36,3	21355	52,8	24,9	o	+	-
R1.6	893	1,44	0,39	37,8	15842	54,4	24,2	o	+	-
R1.7	895	1,47	0,36	49,4	6981	61,4	18,6	o	+	-

R1.8	893	1,49	0,35	53,7	9757	63,9	17,9	o	+	-
R1.9	891	1,53	0,26	59,4	11417	68,2	14,7	o	+	-
R1.10	901	1,38	0,20	56,3	8098	70,8	13,1	o	+	-
R2.1	886	1,57	1,93	15,0	727	27,5	35,1	u	+	-
R2.2	897	1,21	0,76	39,1	4646	28,7	32,0	u	+	-
R2.3	885	1,38	0,43	20,4	38345	41,9	30,3	u	+	-
R2.4	887	1,34	0,27	22,6	17055	51,3	24,4	u	+	-
R2.5	885	1,43	0,40	29,4	28015	54,2	24,8	u	+	-
R2.6	886	1,37	0,30	30,7	23783	59,3	21,2	u	+	-
R2.7	880	1,45	0,29	41,9	25308	63,1	18,7	u	+	-
R2.8	882	1,53	0,29	51,8	14688	64,9	17,6	u	+	-
R2.9	883	1,48	0,30	56,8	15137	70,9	13,3	u	+	-
R2.10	869	1,71	0,28	62,5	18935	72,6	12,5	u	+	-
R3.1	877	1,27	-	-	-	-	-	u	+	+
R4.1	891	1,28	-	-	7383	-	-	u	-	+
R5.1	890	1,66	-	-	18800	-	-	u	-	+
R6.1	898	1,33	-	-	3941	-	-	u	-	+
R7.1	881	1,42	-	-	14309	-	-	o	-	+
R8.1	903	0,90	-	-	1400	-	-	o	-	+

### 7.3 Übersicht über die Zusammensetzung von Cremes stabilisiert mit Birkenkorkextrakt (3.3.6)

Die Werte in der folgenden Tabelle beziehen sich auf die Herstellung von 2 g Creme nach dem Spritze-Spritze Verfahren (2.2.3.1.2). Der Extraktgehalt im jeweiligen Gel wird konstant bei 6 % (m/m) gehalten.

*Tabelle 20: Zusammensetzung von Cremes stabilisiert mit OSE und SCFE*

<b>Wassergehalt [%]</b>	<b>Masse Wasser [g]</b>	<b>Masse Öl [g]</b>	<b>Masse Extrakt [g]</b>
0 (Gel (16 g))	X	15,112	0,888
17	0,333	1,567	0,100
23	0,461	1,447	0,092
28	0,571	1,343	0,086
33	0,660	1,260	0,080
38	0,760	1,166	0,074
43	0,860	1,072	0,068



#### 7.4 Abscheidebehälter für modifiziertes RESS-Verfahren

Für Vorversuche wird ein 100 ml Schottglas (h = 9,5 cm;  $\varnothing$  in. = 4,2 cm) verwendet, in dessen Deckel mithilfe eines glühenden Metallstiftes Löcher, sowohl für die Rohrleitung zur Düse als auch für das Entweichen des gasförmigen CO<sub>2</sub>, eingebrannt werden (Abbildung 63a). Da es bei diesen Vorversuchen zu starker Trockeneisbildung innerhalb des Abscheidegefäßes kommt, wird ein Kunststoffzylinder (PP) mit größerem Volumen (h = 20,5 cm;  $\varnothing$  in. = 4 cm) gewählt (Abbildung 63b).

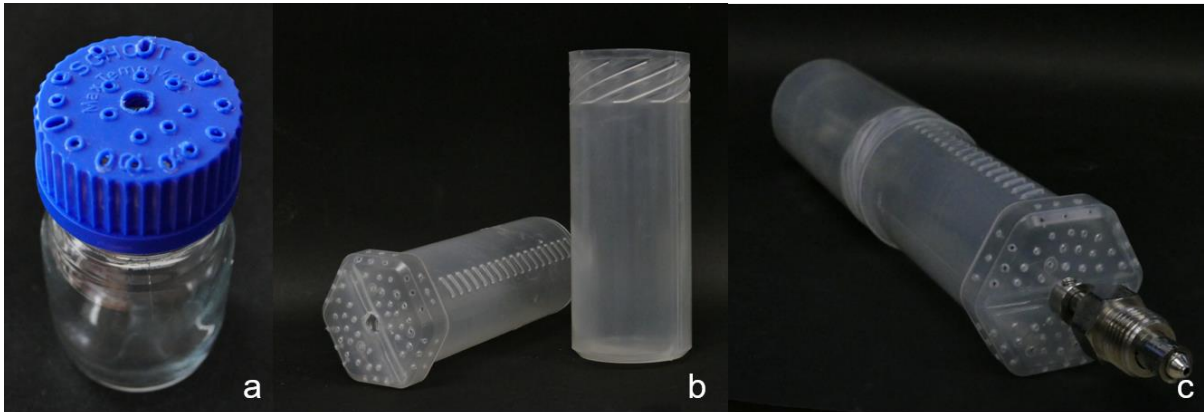


Abbildung 63: Abscheidebehälter für modifiziertes RESS-Verfahren

Abbildung 63c zeigt den zusammengebauten Abscheidebehälter mit eingesetzter Düse. Die Verbindung zwischen Ober- und Unterteil des Behälters wird vor dem Einsetzen in die Anlage mit Parafilm verschlossen.