



FAU Forschungen, Reihe B, Medizin, Naturwissenschaft, Technik 37

Christoph Rupp

Mikroverkapselung von Hopfenextrakt
zur Entwicklung eines biologischen
Pflanzenschutzmittels gegen
den Falschen Mehltau

Christoph Rupp

Mikroverkapselung von Hopfenextrakt zur Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels gegen den Falschen Mehltau

FAU Forschungen, Reihe B
Medizin, Naturwissenschaft, Technik
Band 37

Herausgeber der Reihe:
Wissenschaftlicher Beirat der FAU University Press

Christoph Rupp

**Mikroverkapselung von Hopfenextrakt
zur Entwicklung eines biologischen
Pflanzenschutzmittels gegen
den Falschen Mehltau**

Erlangen
FAU University Press
2021

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek:
Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Autoren-Kontaktinformation: Christoph Rupp, Lehrstuhl für Prozessmaschinen und Anlagentechnik, c.rupp.fau@gmail.com, ORCID: 0000-0002-2157-149X.

Bitte zitieren als

Rupp, Christoph. 2021. *Mikroverkapselung von Hopfenextrakt zur Entwicklung eines biologischen Pflanzenschutzmittels gegen den Falschen Mehltau*. FAU Forschungen, Reihe B, Medizin, Naturwissenschaft, Technik Band 37. Erlangen: FAU University Press.
DOI: 10.25593/978-3-96147-395-3.

Das Werk, einschließlich seiner Teile, ist urheberrechtlich geschützt. Die Rechte an allen Inhalten liegen bei ihren jeweiligen Autoren. Sie sind nutzbar unter der Creative-Commons-Lizenz BY.

Der vollständige Inhalt des Buchs ist als PDF über den OPUS-Server der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg abrufbar: <https://opus4.kobv.de/opus4-fau/home>

Verlag und Auslieferung:
FAU University Press, Universitätsstraße 4, 91054 Erlangen

Druck: docupoint GmbH

ISBN: 978-3-96147-394-6 (Druckausgabe)
eISBN: 978-3-96147-395-3 (Online-Ausgabe)
ISSN: 2198-8102
DOI: 10.25593/978-3-96147-395-3

**Mikroverkapselung von Hopfenextrakt zur
Entwicklung eines biologischen
Pflanzenschutzmittels gegen den Falschen
Mehltau**

Der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung der Doktorgrades Dr.-Ing.

vorgelegt von
Christoph Rupp
aus Roth

am 01.05.2020

Als Dissertation genehmigt
von der Technischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.2020

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr.-Ing. habil. Andreas Paul
Fröba

Gutachter: Prof. Dr.-Ing. Eberhard Schlücker
Prof. Dr. Geoffrey Lee

Vorwort

Die vorliegende Forschungsarbeit entstand während meiner Zeit am Lehrstuhl für Prozessmaschinen und Anlagentechnik an der Universität Erlangen-Nürnberg. Dank des sehr großen Engagements des Lehrstuhlleiters Herrn Prof. Dr. E. Schlücker für den biologischen Pflanzenschutz konnten in den vergangenen Jahren die notwendigen Grundlagen geschaffen werden, um das interdisziplinäre Thema dieser Arbeit erfolgreich zu bearbeiten. An erster Stelle möchte ich ihm deshalb meinen besonderen Dank aussprechen, da er mir als Doktorvater die Bearbeitung dieser interessanten Thematik ermöglichte.

Die Forschung wurde im Rahmen eines Projekts durchgeführt, welches mithilfe der Wissenschaftsförderung der Deutschen Brauwirtschaft und der Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft ins Leben gerufen wurde. Ich möchte Frau Dr. E. Hinzmann von der Wissenschaftsförderung, Herrn Dr. M. Biendl der Firma Hopsteiner und Herrn Dr. F. Weihrauch vom Hopfenforschungszentrum Hüll für die stets gute und produktive Zusammenarbeit danken.

Vielen Dank ebenfalls an die Lehrstühle „Pharmazeutische Technologie“, „Feststoff- und Grenzflächenverfahrenstechnik“ und „Zellbiologie“, die durch die Bereitstellung von Messinstrumenten eine vielseitige Betrachtung meines Forschungsthemas ermöglichten. Es hat mich sehr gefreut, dass eine so unkomplizierte und freundliche Zusammenarbeit zwischen den Lehrstühlen möglich war.

Meinen Kollegen des Lehrstuhls möchte ich für das sehr angenehme Arbeitsklima und für die Unterstützung danken. Insbesondere Herrn Dr. S. Schwab gilt mein Dank, da er mir von Beginn an – zunächst bei meiner Masterarbeit und anschließend während meiner Doktorarbeit – mit Rat und Tat zur Seite stand und eine unentbehrliche Hilfe war. Vielen Dank an die Techniker der Werkstatt des Lehrstuhls, ohne die der Aufbau und Betrieb der Verkapselungs-Anlagen nicht möglich gewesen wäre. Besonders Herrn Oliver Weisert und Herrn Florian Klein möchte ich für die schnellen Fertigungen, Reparaturen und nicht zuletzt für die aufheiternde und gute Gesellschaft danken.

Abschließend bedanke ich mich bei meinen Masterstudenten Fabian, Bernd, Corinna, Jochen, Nico, Korbi, Annika, Julian, Tom und Anna-Lena für ihre Unterstützung bei der Durchführung der Versuche. Euer Interesse

und eure Motivation an der Thematik waren auch stets für mich ein Ansporn, immer wieder neuen Fragen nachzugehen.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	GRUNDLAGEN	5
2.1	Biologie und Wirkstoffe des Echten Hopfens.....	5
2.1.1	Botanik des Echten Hopfens (<i>Humulus lupulus</i> L.)	5
2.1.2	Historische und aktuelle Anwendungen des Hopfens	6
2.1.3	Inhalts- und Wirkstoffe des Hopfens	8
2.1.4	Wirkmechanismus und fungizide Wirkung der Hopfenstoffe	11
2.2	Der Falsche Mehltau im Hopfenbau	12
2.2.1	Der Erreger des Falschen Mehltaus im Hopfen: <i>Pseudoperonospora humuli</i>	13
2.2.2	Biologische Bekämpfungsstrategien gegen Falschen Mehltau	14
2.3	Formulierungstechnik im Pflanzenschutz	15
2.3.1	Auswahl des Formulierungstyps und des Herstellungsverfahrens	16
2.3.2	Steuerung der Produkteigenschaften mittels Mikroverkapselung.....	25
2.3.3	Tenside in Formulierungen	33
2.3.4	Grundlagen zu Lipidmikropartikeln.....	36
2.4	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Lipidmikropartikeln	39
3	MATERIALIEN UND METHODEN	43
3.1	Materialien	43
3.1.1	Matrixmaterialien.....	43
3.1.2	Hopfenextrakt.....	44
3.1.3	Emulgatoren.....	44
3.1.4	Dispergiermittel.....	46
3.1.5	Antioxidantien, UV-Schutzmittel	47
3.1.6	Haftmittel.....	47
3.1.7	Sonstige Chemikalien.....	48
3.2	Methoden.....	49
3.2.1	Herstellung von Pulvern	49
3.2.2	Suspensionsstabilität.....	51
3.2.3	Messung der freigesetzten Wirkstoffmenge	51
3.2.4	Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeuger	55

3.2.5	Überprüfung der Wirkstoffstabilität	57
3.2.6	Dynamische Differenzkalorimetrie	59
3.2.7	Bestimmung der Wasseraktivität	59
3.2.8	Auftragen der Kapseln auf Trägerplatten und Test der Regenfestigkeit.....	60
3.2.9	Optische Charakterisierung.....	62
3.2.10	Beurteilung der biologischen Wirksamkeit anhand von Blattscheibenversuchen	64
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	67
4.1	Auswahl geeigneter Matrixmaterialien.....	67
4.1.1	Verkapselungstauglichkeit verschiedener Materialien	67
4.1.2	Wirkstoffstabilität in Lipidpartikeln	69
4.2	Entwicklung und Validierung der Methode zur Partikelgrößenbestimmung mittels Laserbeuger	70
4.2.1	Bestimmung der Partikelgröße mittels Bildauswertung.....	70
4.2.2	Bestimmung des Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln.....	71
4.2.3	Validierung der Messmethode mittels Laserbeuger.....	73
4.3	Effekte von Emulgatoren auf die Kapseleigenschaften.....	76
4.3.1	Vergleich einzelner Emulgatoren	76
4.3.2	Kombination von Emulgatoren	81
4.3.3	Einstellung der Mengenverhältnisse	83
4.4	Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln	86
4.4.1	Vergleich interner und externer Emulgatorzugabe.....	87
4.4.2	Freisetzungskinetik.....	90
4.4.3	Einfluss durch Destabilisierung der Kapselmatrix	92
4.5	Zusatz von Dispergiermitteln	96
4.6	Stabilitätsuntersuchungen.....	100
4.6.1	Stabilität der Wirkstoffe	100
4.6.2	Veränderung der Kapseleigenschaften durch Lagerung.....	109
4.7	Untersuchungen zur Retention der Kapseln auf hydrophober Oberfläche.....	120
4.7.1	Auswirkung von Emulgatoren auf die Retention	120
4.7.2	Auswirkung von Haftmitteln auf die Regenresistenz.....	124

4.8	Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit	127
4.8.1	Blattscheibenuntersuchungen	127
4.8.2	Freilandversuche	136
5	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	139
6	LITERATURVERZEICHNIS	143
7	ANHANG.....	153

Abkürzungen

A-Staub	Alveonengängige Fraktion
Asc	Ascorbinsäure
BHA	Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BÖLW	Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft
Car	Carotin
CMC	kritische Mizellbildungskonzentration (<i>critical micelle concentration</i>)
CS	Kapselsuspension
DAD	Diodenarray-Detektor
e.V.	Eingetragener Verein
EC	Emulgierbares Konzentrat
EOF	Elektroosmotischer Fluss
E-Staub	Einatembare Fraktion
EW	Emulsion
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H	Wasserstoff
HCl	Salzsäure
HHV	Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft m.b.H.
HLB	<i>hydrophilic-lipophilic balance</i>
HPCE	<i>High performance capillary electrophoresis</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
LED	<i>Light-emitting diode</i>
Licowax 1	Licowax PED Emulsion
Licowax 2	Licowax PED Anionic Emulsion
MEKC	Mizellare elektrokinetische Chromatographie

Abkürzungen

MeOH	Methanol
MG	Monoglycerid (Softenol 3995)
N ₂	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
OH	Hydroxy-Gruppe
PEG	Polyethylenglycol
pKs	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
SC	Suspensionskonzentrat
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Suspoemulsion
SL	Wasserlösliches Konzentrat
SLP	Lipidmikropartikel (<i>solid lipid particles</i>)
SP	Wasserlösliches Pulver
TAG	Triacylglycerid
TBHQ	Tertiäres Butylhydrochinon
TIC	Temperaturmessstelle (<i>temperature indication control</i>)
Toc	DL- α -Tocopherol
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
VE	Vollentsalzt
VIS	<i>Visible</i>
w%	Gewichtsprozent
WG	Wasserdispergierbares Granulat
WHO	<i>World Health Organization</i>
WP	Wasserdispergierbares Pulver
ZE	Zuckerester

Symbole

x	Partikelgröße
λ	Wellenlänge
m	Masse
S	Suspensionsstabilität
Q	Trockenmasse Filterkuchen
b	komplexer Brechungsindex
n	Realteil des Brechungsindex
k	Imaginärteil des Brechungsindex
i	imaginäre Einheit
t	Zeit
θ_k	Kontaktwinkel
r	Porenradius
l	Eindringtiefe
γ_{LV}	Grenzflächenspannung
η	dynamische Viskosität
w_{sSt}	Stokessche Sinkgeschwindigkeit
ρ_p	Partikeldichte
ρ_f	Fluiddichte
g	Erdbeschleunigung
M	molare Masse
W	Wendepunkt
Q_r	Summenverteilung

Symbole

q_r Dichteverteilung

x_{50} Medianwert

x_h Modalwert

Abstract

The plant disease downy mildew threatens the organic production of numerous food plants, such as grapevine, hops and some fruits and vegetables. Today the only available fungicides in organic farming are based in copper. However, due to its accumulation in soils and negative effects on birds, small mammals and earthworms, the European Union demands a reduction of the heavy metal and even considers a ban, if an environmentally friendly alternative is found. Therefore, a new substance must be discovered or else the organic production of mentioned foods is in jeopardy. During the investigation of possible alternatives, an extract from hop cones was reported to have a fungicidal effect against downy mildew. However, to use the highly viscous, poorly water soluble and unstable extract as a plant protecting agent, its product properties need to be adapted to the application.

The formulation method of microencapsulation was used in this research project in order to transform the hop extract into an applicable and highly active powder, which should provide a long-lasting effect. Using the spray congealing process, the active ingredients were encapsulated into a solid lipid matrix particle. Adjuvants, such as emulsifiers, dispersing agents and antioxidants, were included into the capsule to optimize the product features for its use in plant protection. Finally, leaf-disc-assays showed, that the developed capsule-prototypes can prevent an infection with the pathogen completely. Thereby it could be proven that microencapsulated hop extract is a promising plant protecting agent against downy mildew that might be able to replace copper in the future.

1 Einleitung

Weltweit befindet sich die Landwirtschaft in einer kritischen Phase. Während in den letzten Jahrzehnten vor allem das Prinzip der Kostenführerschaft und die Rohstoffproduktion im Vordergrund stand, ist ein Umdenken in der Gesellschaft hin zu nachhaltigeren Konzepten festzustellen. [1] Zum Beispiel sind durch die exzessive Verwendung von Herbiziden und den wiederholten Anbau gleicher Sorten sogenannte „Superunkräuter“ entstanden. Diese sind resistent gegen die bekannten chemischen Unkrautvernichtungsmittel und führen zu immer größeren Ernteschäden. Weiterhin haben Skandale bei konventionell erzeugten Lebensmitteln, wie zum Beispiel der Fund von resistenten Keimen (*Staphylococcus aureus*) im Putenfleisch von Discountern oder der wiederholte Nachweis des Insektengifts Fibronil in Eiern, die Verbraucher sensibilisiert, nicht mehr nur auf den Preis, sondern vielmehr auf die Qualität landwirtschaftlicher Erzeugnisse zu achten. Dies hat zu einer stetig steigenden Nachfrage ökologisch erzeugter Produkte geführt, die durch die Produktion in Deutschland nicht gedeckt werden kann. Da der Import von Bio-Lebensmittel aus fernen Ländern mit negativen Umwelteinwirkungen verbunden ist, hat die Bundesregierung sehr ambitionierte Ziele für den ökologischen Landbau definiert: bis zum Jahr 2030 soll dieser einen Anteil von 20 % an der landwirtschaftlich genutzten Fläche in Deutschland einnehmen. Zwar hat der Anteil 2017 mit 8,2 % den bisher höchsten Wert erreicht, aber noch sind sehr viele Herausforderungen zu meistern. [2] Eine Voraussetzung ist die Entwicklung von umweltfreundlichen Pestiziden. Denn ohne die Verwendung von Pflanzenschutzmitteln kann auch der ökologische Landbau nicht überleben.

Die Problematik ist sehr gut anhand der Pflanzenkrankheit Falscher Mehltau, die durch Eipilze der Ordnung Peronosporales hervorgerufen wird, zu erkennen. Es existieren verschiedene Erreger, welche im Gemüse-, Obst-, Wein- oder Hopfenbau (Abbildung 1) auftreten können. Unbehandelt kann der Pilzbefall zu kompletten Ernteaussfällen führen, weshalb ein erfolgreicher Anbau der betroffenen Kulturen nur durch Maßnahmen zum Pflanzenschutz garantiert werden kann. Bisher wird im ökologischen Landbau auf den Wirkstoff Kupfer zurückgegriffen. Der Einsatz des Schwermetalls steht jedoch nicht im Einklang mit dem Nachhaltigkeitsgedanken der ökologischen Landwirtschaft: Es reichert sich im Boden an und kann negative Effekte auf die Organismengruppen Vögel,

Kleinsäuger und Regenwürmer haben. Zwar wurden verschiedene Maßnahmen getroffen, um die eingesetzte Kupfermenge von einst über 80 kg Reinkupfer pro ha und Jahr auf 3 kg/ha jährlich (4 kg/ha im Hopfenbau) zu reduzieren, ein kompletter Ersatz des Mittels ist jedoch ohne wirksame Alternative nicht möglich. [3]



Abbildung 1: Hopfendolden ohne Befall (links) und mit Befall durch den Falschen Mehltau (rechts)

Dabei wurden bereits verschiedene Wirkstoffe pflanzlichen Ursprungs entdeckt, die eine hohe Wirksamkeit gegen den Erreger des Falschen Mehltau aufweisen. Besonders erstaunlich ist, dass ein Extrakt aus den Dolden des Hopfens die Erreger inaktivieren kann. Damit stellt die Kultur die Substanzen zur Verfügung, mit denen sie selbst geschützt werden könnte. Eine Anwendung des Hopfenextrakts als Pflanzenschutzmittel ist jedoch mit einigen Herausforderungen verbunden: Er ist hochviskos, schlecht wasserlöslich und instabil gegenüber Oxidation und Licht. Die Eigenschaften müssen deshalb gezielt an die Anforderungen im Pflanzenschutz angepasst werden. Dies kann durch die Entwicklung einer geeigneten Formulierung erfolgen.

Ziel der vorliegenden Forschungsarbeit ist, einen Hopfenextrakt in ein anwendbares, hochwirksames Pflanzenschutzmittel zu verwandeln, das im ökologischen Hopfenbau als nachhaltiger Ersatz von Kupfer eingesetzt werden kann. Die Grundlage der Entwicklung bildet die Auswahl der besten Formulierungsmethode und des Herstellungsverfahrens. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Mikroverkapselung durch Sprüherstarrung verwendet. Die Optimierung der chemischen Rezeptur der Mikrokapseln stützt sich auf Untersuchungen zu Partikelgröße, Dispergierbarkeit, Suspensionsstabilität, Freisetzung der Wirkstoffe, Wirkstoffstabilität, Haftverhalten und zur biologischen Wirksamkeit. Weiterhin werden

Methoden zur Strukturanalyse der Partikeln durchgeführt, um Effekte durch Lagerung nachvollziehen zu können.

2 Grundlagen

Die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels ist ein sehr aufwändiger Prozess, bei welchem der Wirkstoff und die Formulierungsform optimiert werden müssen, um die beste Wirksamkeit gegen den Schaderreger zu erzielen. Das Anforderungsprofil eines Pflanzenschutzmittels ist sehr umfangreich und speziell in der ökologischen Schädlingsbekämpfung müssen viele Faktoren, wie Regularien, Wirtschaftlichkeit, Nachhaltigkeit und Umweltschutz berücksichtigt werden. In einem Webauftritt der Firma Bayer wird die Entwicklungsdauer eines Pflanzenschutzmittels von der Idee bis zum marktreifen Produkt auf ca. zehn Jahre geschätzt, wobei Kosten von rund 200 Mio. Euro anfallen [4]. Der Entwicklungsprozess erstreckt sich von der Entdeckung des Wirkstoffes über die Formulierung eines Pflanzenschutzmittels, die Evaluierung in Feldversuchen bis hin zur Aufstellung des Herstellungsprozesses und letztlich den behördlichen Genehmigungsverfahren.

In diesem Kapitel sind die theoretischen Grundlagen zum Entwicklungsprozess zusammengefasst. Hierbei wird zunächst die Hopfenpflanze beschrieben, das Potenzial der Hopfenwirkstoffe erklärt und auf den Falschen Mehltau im Hopfenbau eingegangen. Im Anschluss wird aufgezeigt, wie der Wirkstoff zu einem Pflanzenschutzmittel formuliert werden kann. Insbesondere wird auf die Anforderungen an das Endprodukt und die Herausforderungen im Hinblick auf den natürlichen Wirkstoff und den biologischen Pflanzenschutz eingegangen.

2.1 Biologie und Wirkstoffe des Echten Hopfens

Der Wirkstoff stammt aus der zu schützenden Kultur selbst, weshalb im Folgenden zunächst die Hopfenpflanze und im Anschluss das Potenzial ihrer Wirkstoffe beschrieben wird.

2.1.1 Botanik des Echten Hopfens (*Humulus lupulus* L.)

Der Echte Hopfen (*Humulus lupulus* L.) gehört zur Gattung *Humulus*, Familie Cannabaceae und Ordnung Rosales [5]. Es handelt sich um eine zweihäusige Pflanze, was bedeutet, dass sich an einer Pflanze ausschließlich entweder männliche oder weibliche Blüten befinden. Die für die Brauindustrie interessanten Dolden werden nur von weiblichen Pflanzen ausgebildet. Männlicher Hopfen muss in Deutschland vernichtet

werden, um eine Befruchtung der weiblichen Blüten zu verhindern, da es sonst zur unerwünschten Samenbildung in den Dolden kommt. Das Wurzelsystem des Hopfens ist ausdauernd, d.h. die Pflanze kann mehrere Jahre alt werden und dabei jährlich blühen. Dazu wird der oberirdische Teil der Pflanze bei der Ernte abgeschnitten, sodass nur der Wurzelstock erhalten bleibt, welcher im Frühjahr erneut austreiben kann. Aus „schlafenden“ Knospen am Wurzelstock entstehen Triebe, die mit Klimmhaaren besetzt sind. Dadurch wird der Pflanze das Hochranken ermöglicht. Je nach Anleiert werden zwei bis sechs Triebe pro Wurzelstock genutzt und der Rest abgeschnitten. [6, S. 110] Die Reben wachsen durchschnittlich 10 cm pro Tag, unter optimalen Bedingungen sind auch 30 cm möglich. Ab Erreichen der halben Gerüsthöhe (ca. 3 – 4 m) bilden sich Seitentriebe aus. Diese sind entscheidend für den Ertrag, da Dolden fast ausschließlich auf ihnen zu finden sind. Etwa Anfang Juli, nach Erreichen der Gerüsthöhe, beginnt die drei bis vier Wochen lange Blütezeit. Diese unterteilt sich in die Ausdoldung und Reife, nach der schließlich die Ernte stattfindet. [7, S. 46]

Eine Kultivierung des Hopfens ist zwischen dem 35. und 55. geographischen Breitengrad der nördlichen und südlichen Halbkugel möglich, da dort die klimatischen Voraussetzungen erfüllt sind. Die Temperatur sollte im Winter für mehrere Wochen unter 5 °C liegen, damit die Knospen des Wurzelstocks in der „schlafenden“ Phase verweilen können. Ist die Zeit verkürzt oder nicht vorhanden, treiben die Triebe langsamer und ungleichmäßig. [8, S. 5] Ein weiterer entscheidender Faktor für den Hopfenanbau ist eine ausreichende Tageslänge während der Wachstumsphase. In den klassischen Anbaugebieten liegt diese bei ca. 18 Stunden. Die Hopfenpflanze wächst besonders gut auf lehmigen Sandböden oder sandigen Lehmen und bei hohen Durchschnittstemperaturen mit viel Niederschlag. [7, S. 48 - 49]

2.1.2 Historische und aktuelle Anwendungen des Hopfens

Heutzutage werden ca. 98 % der weltweiten Hopfenproduktion zum Brauen von Bier verwendet [9]. Seit dem Erlass des Bayerischen Reinheitsgebots 1516 sind für das Bierbrauen ausschließlich die Zutaten Wasser, Gerstenmalz, Hefe und Hopfen zugelassen [10]. Hopfen wurde in erster Linie zur Verlängerung der Haltbarkeit hinzugefügt, wobei mittlerweile das Aroma und die Stabilisierung der Schaumkrone eine mindestens ebenso wichtige Rolle spielen. Die Geschichte des Hopfens

reicht jedoch weit vor die Zeit des Reinheitsgebots zurück. Archäologen haben Hopfensamen in jungsteinzeitlichen Siedlungen entdeckt, wo die Pflanze vermutlich zu medizinischen Zwecken angewandt wurde. Bereits im 9. Jahrhundert wurde Hopfen als Nutzpflanze angebaut und fermentierten Getränken zur Verlängerung der Haltbarkeit zugefügt. Die ersten schriftlichen Überlieferungen liegen aus dem 11. Jahrhundert vor, in denen die entzündungshemmende Wirkung des Hopfens von Mesue, einem arabischen Arzt, beschrieben wurde. In der westlichen Medizin war es Hildegard von Bingen, die in ihrem Werk „Physica“ aus dem 12. Jahrhundert erstmals die antimikrobielle Wirkung des Hopfens nannte. [11]

Mittlerweile ist eine hohe Zahl weiterer Wirkungen des Hopfens bekannt. Dazu gehört allem voran der sedative Effekt, weshalb die Pflanze gegen Schlafstörungen und Stimmungsstörungen wie Ruhelosigkeit und Angststörungen eingesetzt werden kann [9]. In den letzten Jahren ist das medizinische Interesse an Hopfen als Heilpflanze stark gewachsen. Im Jahr 2007 wurde das Gewächs von einer Forschungsgruppe der Universität Würzburg zur Heilpflanze des Jahres gekürt [11]. Es liegt eine Vielzahl an Veröffentlichungen vor, die die medizinische Wirkung der Hopfeninhaltsstoffe belegt. Unter diesen sind beispielsweise eine anti-carcinogene [12] und entzündungshemmende [13] Wirkung sowie ein inhibitorischer Effekt in mehreren Stufen bei der Entstehung von chronischen Lebererkrankungen [14]. Auch in anderen Bereichen sind positive Eigenschaften bekannt. In Kosmetikprodukten kann Hopfen als Zusatzstoff mit antimikrobieller und antitranspirativer Funktion beispielsweise in Gesichtsmasken verwendet werden [15]. Auch als Futtermittelzusatzstoff ist Hopfen zugelassen. Hier könnte die antimikrobielle Wirkung gegen grampositive Bakterien einen übermäßigen Einsatz von Antibiotika verhindern [16]. Darüber hinaus wurden Hopfenextrakte gegen Erreger von Pflanzenkrankheiten erfolgreich getestet und dadurch deren Potenzial als ökologisches Pflanzenschutzmittel entdeckt. Es konnten Wirksamkeiten gegen den Pilz der Dürrfleckenkrankheit (*Alternaria solani*) [17], den Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata*) [18], den Erreger des Falschen Mehltaus der Kartoffel (*Phytophthora infestans*) [19] und der Weinrebe (*Plasmopara viticola*) [20] und gegen das Pathogen der Amerikanischen Faulbrut (*Paenibacillus larvae*) [21] nachgewiesen werden.

2.1.3 Inhalts- und Wirkstoffe des Hopfens

Die Bestandteile der Hopfenpflanze unterscheiden sich je nach Sorte, Klima, Standort, Erntezeitpunkt und der Lagerung [11]. Die wirksamen Inhaltsstoffe des Hopfens befinden sich in erster Linie in den Dolden – genauer in den Lupulindrüsen (glanduläre Trichome) der Dolden. Luftgetrocknete Dolden setzen sich im Durchschnitt aus 10 % Wasser, 24 % Bitterstoffen, 5 % Polyphenolen und 1 % ätherischen Ölen zusammen. Die restlichen 60 % bestehen aus Cellulose, Ligninen, Pektinen, Proteinen, Aminosäuren, Fetten, Kohlenhydraten und Mineralstoffen [11]. Als Wirkstoffe werden die enthaltenen Bitterstoffe, Polyphenole und ätherischen Öle bezeichnet. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Terpene, Bittersäuren und Chalkone (z.B. Xanthohumol), aber auch Flavonoide (z.B. Kaempferol) und Catechine sind enthalten. Zur Gewinnung eines mit Wirkstoffen angereicherten Extrakts sind zwei Verfahren etabliert: Die Extraktion mittels Ethanol oder mittels überkritischen CO₂. Die CO₂-Extraktion ist sehr gut zum Auszug der sog. Weichharze (v.a. Bittersäuren) und des Hopfenöls geeignet, während im ethanologischen Extrakt eine größere Variation von Wirkstoffen gewonnen wird. [9]

In Bezug auf den Falschen Mehltau wurde die Wirksamkeit eines Hopfenextrakts am Staatlichen Weinbauinstitut Freiburg zwischen 2011 und 2013 im Rahmen eines Projekts im Bundesprogramm Ökologischer Landbau und andere Formen nachhaltiger Landwirtschaft (BÖLN) festgestellt. Die fungizide Wirksamkeit konnte dabei den Bittersäuren und dem Xanthohumol zugeteilt werden. [20] Für die Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels gegen den Falschen Mehltau soll deshalb der ethanologische Extrakt verwendet werden, da in diesem alle wirksamen Substanzen enthalten sind. Diese werden im Folgenden näher beschrieben.

2.1.3.1 Chemie der Hopfenbittersäuren

Zu den Hopfenbittersäuren gehören die beiden Gruppen der α -Säuren (Humulone) und der β -Säuren (Lupulone). Der Hauptbestandteil der α -Säuren ist das Humulon (35 – 70 %), wobei außerdem noch Cohumulon (20 – 55 %) und Adhumulon (10 – 15 %) sowie weitere analoge Verbindungen wie Prehumulon (1 – 10 %) und Posthumulon (1 – 5 %) vorliegen [22]. Wie bei den α -Säuren gibt es auch bei den β -Säuren eine homologe Reihe zum Hauptbestandteil des Lupulons (30 – 55 %). Daneben liegen Colupulon (20 – 55 %), Adlupulon (5 – 10 %), Prelupulon (1 – 3 %) und Postlupulon (< 1 %) vor [22]. Die chemischen Strukturen der Bitterstoffe sind in Abbildung 2 dargestellt.

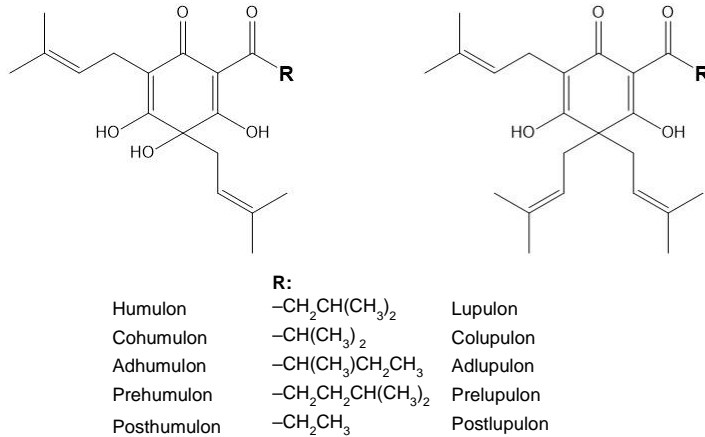


Abbildung 2: Strukturformel der Humulone (links) und Lupulone (rechts) mit Summenformel der Reste der Acylgruppe

Die α -Säuren besitzen einen pK_s -Wert zwischen 4 und 5,5. Es handelt sich um schwache Säuren, welche im Wasser zum Großteil undissoziiert vorliegen. Der pK_s -Wert der Lupulone liegt im Bereich von 5,5 bis 7,8 und damit über dem der Humulone. [23] Die Bittersäuren sind lipophil und unter normalen Bedingungen sehr schlecht wasserlöslich. Literaturangaben zufolge besitzen Humulone eine Löslichkeit im Wasser von ca. 3,5 g/l bei 25 °C und einem pH-Wert von 7. Die Löslichkeit der Lupulone ist mit ca. 2 mg/l bei gleichen Bedingungen deutlich geringer. [24] Da es sich um schwache Säuren handelt, ist die Wasserlöslichkeit stark pH-abhängig. Bei niedrigen pH-Werten liegen mehr undissoziierte Gruppen vor, wodurch die Löslichkeit in Wasser sinkt. Dies bewirkt, dass beispielsweise bei einem pH-Wert von 5, wie er im Brauwasser vorliegt, nur noch etwa 40 mg/l der Humulone [6, S. 544] und ca. 1 mg/l der Lupulone gelöst vorliegen [6, S. 547].

Die Bittersäuren können unter bestimmten Bedingungen reagieren. Die α -Säuren werden beispielsweise während des Würzekochens beim Bierbrauen oder durch UV-Strahlung in Iso- α -Säuren überführt. Diese besitzen eine deutlich höhere Wasserlöslichkeit [6, S. 552]. Sowohl bei den α - als auch bei den β -Säuren kann es zu einem oxidativen Abbau durch Luftsauerstoff kommen, was als Autoxidation bezeichnet wird. In erster Linie werden dabei die Doppelbindungen und tertiäre Kohlenstoffe angegriffen, wodurch eine Vielzahl an Abbauprodukten entstehen kann [22]. Die Lupulone werden am schnellsten oxidiert. Von ihnen wird innerhalb eines Monats an der Luft und bei Raumtemperatur etwa die Hälfte abgebaut. [25] Es entstehen beispielsweise Hulupone durch

Aufbrechen des aromatischen Sechsrings (siehe Abbildung 3). Durch Oxidation kann es aber auch zur Ringbildung und Epoxidierung der Prenyl-Seitenketten kommen, wobei der aromatische Sechsring erhalten bleibt. [26]

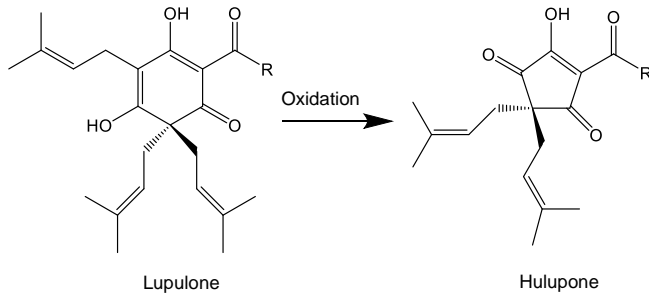


Abbildung 3: Oxidativer Abbau der Lupulone zu Huluponen

2.1.3.2 Chemie des Xanthohumols

Bei Xanthohumol handelt es sich um ein prenyliertes Chalkon, das ausschließlich im Hopfen bzw. in dessen Dolden zu finden ist. Mit einem Anteil von bis zu 1,1 % in getrockneten Dolden ist es das wichtigste Prenylflavonoid des Hopfens [11]. Während des Würzekochens beim Bierbrauen kann Xanthohumol zum Flavanon Isoxanthohumol isomerisieren (siehe Abbildung 4) [27]. Die Wasserlöslichkeit von Xanthohumol ist mit ca. 1,3 mg/l bei 23 °C sehr gering [28]. Analog zu den α -Säuren ist die isomerisierte Form deutlich hydrophiler [29].

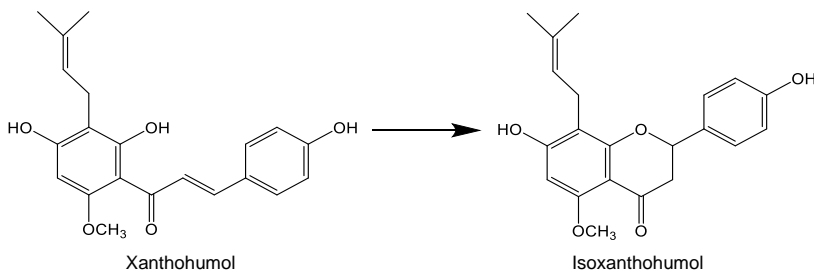


Abbildung 4: Isomerisierung von Xanthohumol zu Isoxanthohumol

2.1.4 Wirkmechanismus und fungizide Wirkung der Hopfenstoffe

Der Wirkmechanismus der Hopfenbittersäuren wurde v.a. im Hinblick auf Bakterien, die im Bier vorkommen können, untersucht. Da im Bier überwiegend Iso-Humulone vorliegen, wurde der *mode of action* vorrangig anhand dieser untersucht. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit zu den Humulonen und Lupulonen kann von einer Übertragbarkeit des Mechanismus ausgegangen werden. Bei einer großen Anzahl grampositiver Bakterienstämme konnte eine antibakterielle Wirkung der Bittersäuren nachgewiesen werden, während gramnegative Bakterien resistent sind. Grund dafür ist, dass die Säuren für ihre Wirkung in die Zelle aufgenommen werden müssen. Deshalb ist die Interaktion der Wirkstoffe mit der Zellmembran für eine hohe Wirksamkeit entscheidend. Es konnte festgestellt werden, dass sich Humulone, Iso-Humulone und Lupulone in die Zellmembran grampositiver Bakterien einordnen und es so zu Membran-Läsionen kommt. Infolgedessen wird der aktive Transport von Zuckern und Aminosäuren in die Zelle unterbunden und folglich auch die Zellatmung und die Synthese von Proteinen, RNA und DNA gestoppt. [30] Auch Xanthohumol inaktiviert in erster Linie grampositive Bakterien, während gramnegative resistent sind [31]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Iso- α -Säuren die Aufnahme von undissoziierten Molekülen in die Zelle katalysieren. Im Zellinneren dissoziieren die Bittersäuren durch Protonen-Abgabe und bilden Komplexe mit divalenten Kationen. Die Bitterstoffe agieren als Ionen-Transporter (Ionophore), da sie Protonen in die Zelle bringen. Der Transport von Protonen in die Zelle bewirkt die Auflösung des pH-Gradienten der Zytoplasmamembran und stoppt somit die zur ATP-Synthese benötigte *proton motive force* („Protonen bewegende Kraft“). [32] Es konnte beobachtet werden, dass bei niedrigem pH-Wert die Wirksamkeit der Bittersäuren zunimmt und die Lupulone allgemein stärker wirken als Humulone, da mehr undissoziierte Gruppen vorliegen. Außerdem ist die Wirkung besser, je lipophiler das Molekül ist – d.h. je länger die Acyl-Seitenkette und die Anzahl prenylierter Gruppen [30].

Dass sich der Wirkmechanismus nicht vollständig von Bakterien auf Pilze übertragen lässt, zeigen Untersuchungen aus der Literatur. Versuche anhand *Trichophyton* spp. belegten, dass die Humulone eine höhere fungizide Wirksamkeit als die Lupulone besitzen [33]. Die minimalen inhibitorischen Konzentrationen sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Minimale inhibitorische Konzentrationen der Humulone, Isohumulone und Lupulone [33] bzw. von Xanthohumol und Isoxanthohumol [34] gegen *Trichophyton rubrum*

Molekül	Minimale Hemmkonzentration / $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$
Humulone	100
Isohumulone	> 200
Lupulone	200
Xanthohumol	3,13
Isoxanthohumol	> 200

Des Weiteren kann aus den Versuchen abgeleitet werden, dass die höchste Wirksamkeit von Xanthohumol ausgeht und eine Isomerisierung zu einem Abfall der fungiziden Wirkung führt.

Weitere Faktoren für die Wirksamkeit der Hopfensäuren sind vorliegende Kationen. So wurde festgestellt, dass monovalente Kationen (K^+ , Na^+ und Rb^+) die Wirksamkeit erhöhen und divalente Kationen (Mg^{2+} , Mn^{2+} und Ca^{2+}) die Effizienz von Iso-Humulon senken können. Allerdings besteht ein sehr komplexer Zusammenhang, da monovalente Kationen nur unter der Präsenz von divalenten Kationen gebunden werden. [35]

2.2 Der Falsche Mehltau im Hopfenbau

Der Falsche Mehltau zählt zu den am weitest verbreiteten Pilzkrankheiten im Hopfenbau. Das erste Auftreten des Falschen Mehltaus am Hopfen wurde 1905 von Miyabe und Takahashi in Japan und 1909 in Wisconsin beschrieben. Das erste Vorkommen in Europa kann auf das Jahr 1920 im Vereinigten Königreich zurückgeführt werden, von wo aus sich die Krankheit innerhalb von sieben Jahren in ganz Europa ausbreiten konnte. [36] In der Hallertau, Deutschlands größtem Anbaugebiet, kam es im Jahr 1926 zu einer nahezu kompletten Missernte aufgrund des Falschen Mehltaus, von der sich die Region nur langsam wieder erholen konnte [7, S.54]. Innerhalb kürzester Zeit hat sich die Pilzkrankheit über die ganze Welt verbreitet. Lediglich in Australien, Neuseeland und Südafrika sind bisher noch keine Fälle bekannt [37]. Seit den ersten Berichten über die Krankheit wird nach Methoden gesucht, den Befall in den Hopfengärten zu vermeiden oder zumindest zu verringern. In den folgenden Kapiteln wird zunächst der Erreger des Falschen Mehltaus und dessen Infektionszyklus

beschrieben. Im Anschluss wird auf die Bekämpfungsstrategien im biologischen Pflanzenschutz eingegangen.

2.2.1 Der Erreger des Falschen Mehltaus im Hopfen: *Pseudoperonospora humuli*

Der Falsche Mehltau des Hopfens wird durch den Pilz *Pseudoperonospora humuli* (Miyabe & Takah.) G. W. Wilson (kurz: *P. humuli*) hervorgerufen. Er gehört zum Stamm der Oomycetes (Eipilze), Klasse der Peronossporea, Ordnung der Peronosporales und Familie der Peronosporaceae [38]. Die Infektion der Hopfenpflanze folgt einem Kreislauf, der durch das überwinternde Myzel im Frühjahr gestartet wird. Der Infektionszyklus wird anhand von Abbildung 5 erklärt.

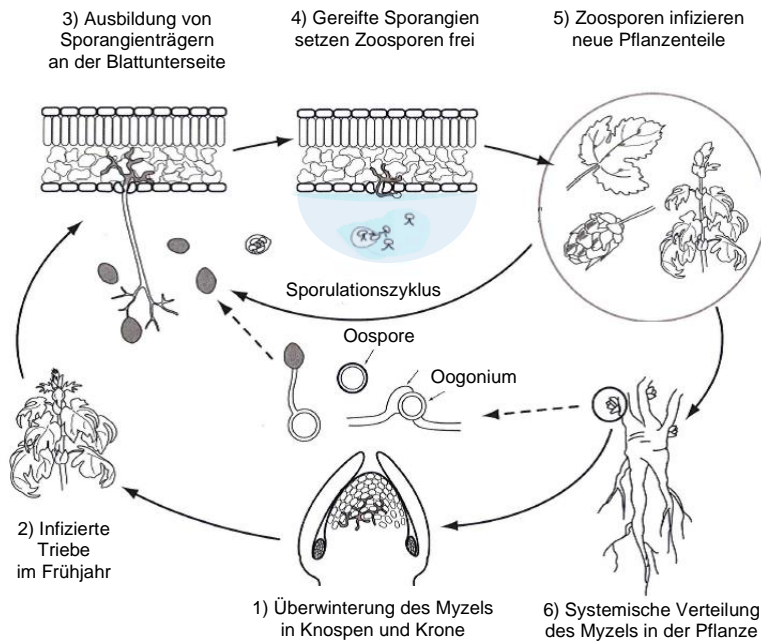


Abbildung 5: Infektionszyklus von *Pseudoperonospora humuli* [37, verändert]

Das Pathogen überwintert bei infizierten Pflanzen in Knospen oder in der Krone am Wurzelstock als intrazelluläres Myzel (1) und breitet sich von dort in die herauswachsenden Triebe bzw. Seitentriebe und Dolden aus (2). Man spricht von einer Primärinfektion, bei der die Dolden nicht vollständig zur Ausbildung kommen. Die Blätter weisen dann eine gelbgrüne bis braune Färbung auf und rollen sich nach unten ein. Auf der Unterseite infizierter Blätter wachsen Sporangienträger heraus (3), in deren

Sporangien Zoosporen gebildet werden. Bei massenhafter Sporangienbildung entsteht auf der Blattunterseite ein lila-grau bis schwarzer Pilzrasen. Zur Sporulation kommt es bei einer hohen Luftfeuchtigkeit (>80 – 90 %) und Nachttemperaturen von mehr als 5 °C. Die optimale Temperatur zur Sporulation liegt zwischen 16 °C und 20 °C. Die reifen Zoosporen werden freigesetzt und auf weitere Hopfenpflanzen bzw. Pflanzenteile verteilt (4). Landet eine Spore in einem Wassertropfen auf Blättern, Nebenblättern, Apikalmeristem oder Dolden, kann das Hopfengewebe durch Stomata infiziert werden. Dies wird als Sekundärinfektion bezeichnet (5). Bei einer Infektion des Apikalmeristems kommt es zu einer systemischen Ausbreitung des Pilzmyzels in der Hopfenpflanze (6) und der Zyklus kann im nächsten Jahr von Neuem beginnen. [37] Zudem werden im infizierten Hopfengewebe Oosporen gebildet, die vor allem im Boden vorzufinden sind, nachdem totes Pflanzengewebe herabgefallen ist. Sie dienen dem Pathogen dazu, ungünstige Bedingungen zu überleben. Die Oosporen können beispielsweise durch Wind transportiert werden und eine Infektion verursachen. [39, S. 132]

Um ein effizientes Pflanzenschutzmittel gegen *P. humuli* zu entwickeln, müssen die Faktoren, die zur Ausbreitung der Krankheit führen, berücksichtigt werden. Eine Bekämpfung der Primärinfektion ist schwierig, da das Pilzmyzel bereits im Pflanzengewebe systemisch ist. Mithilfe von Pflanzenschutzmitteln wird deshalb in erster Linie versucht, die Sekundärinfektion zu verhindern, weil dort die Zoosporen auf der Oberfläche vorliegen. Eine Infektion findet ausschließlich bei Nässe statt. Die Zoosporen müssen innerhalb eines Wassertropfens zunächst auf die Blattoberfläche absinken, dort anhaften und die Stomata penetrieren [40].

2.2.2 Biologische Bekämpfungsstrategien gegen Falschen Mehltau

Die Strategien zur kupferfreien Bekämpfung des Falschen Mehltaus im biologischen Pflanzenschutz sind im „Strategiepapier zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel unter besonderer Berücksichtigung des Ökologischen Landbaus“ [41] aufgeführt. Das Strategiepapier wurde von einem Großteil der deutschen Bio-Anbauverbände wie dem Bund Ökologische Lebensmittelwirtschaft (BÖLW e.V.), Bioland e.V. und Demeter e.V. unterzeichnet. Darin enthalten sind vier Strategiebausteine, um die benötigte Reinkupfermenge im ökologischen Landbau zu minimieren:

- Einsatz von ökotauglichen Alternativen (wenn nötig auch einer Kombination aus mehreren Alternativen)
- Einsparung durch Prognosemodelle, optimaler Applikationstechnik und die Minimierung der Kupfermenge durch neue Formulierungen auf Basis von Kupferhydroxid
- Reduktion der Abhängigkeit von Pflanzenschutzmitteln, z.B. durch optimale Bodenpflege, gute Nährstoffversorgung, Reduktion des Infektionspotenzials, etc.
- Vermehrter Anbau resistenter oder robuster Sorten

Speziell im Hinblick auf den Hopfenbau wurden bereits einige Maßnahmen getroffen, um mit einer bisher noch erlaubten Aufwandmenge von 4 kg Reinkupfer pro Hektar auszukommen. Im Ökohopfenbau werden ausschließlich Sorten angebaut, welche eine gute Resistenz gegen *P. humuli* besitzen. Die Züchtung neuer, resistenterer Sorten ist für die weitere Kupferminimierung nur begrenzt geeignet, da Brauereien meist das Aroma bewährter Sorten beibehalten wollen. Weiterhin existiert im Hopfenbau ein etabliertes Prognosemodell, bei dem Zoosporangien in sog. Sporenfallen aufgefangen und ausgezählt werden. Nur bei vorliegendem Sporangienflug erfolgt ein Spritzaufwurf an die Landwirte, wodurch überflüssige Applikationen vermieden werden.

Auch wenn im Hopfenbau bereits Maßnahmen zur Kupferreduktion erfolgt sind, reichen die bisher zulässigen 4 kg Reinkupfer pro Hektar in Jahren mit hohem Befallsdruck nicht aus. Die Entwicklung wirksamer Alternativen ist deshalb die einzige Möglichkeit, um Kupfer als Pflanzenschutzmittel zu ersetzen bzw. die Aufwandmenge zu verringern. In einem Bericht aus dem Jahr 2015 zum aktuellen Stand des Fortschrittes der im Strategiepapier festgehaltenen Maßnahmen wird Hopfenextrakt bereits als potenzieller Synergist zu Kupfer erwähnt [42].

2.3 Formulierungstechnik im Pflanzenschutz

Damit Hopfenextrakt als Pflanzenschutzmittel verwendet werden kann, muss der Wirkstoff in eine anwendbare und möglichst wirksame Form gebracht werden. Die Entwicklung einer passenden Formulierung bzw. die Auswahl der Formulierungstechnik ist für den Erfolg des Wirkstoffes ausschlaggebend. Vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit wurde eine Liste mit Formulierungstypen von Pflanzenschutzmitteln veröffentlicht, worin 68 verschiedene Arten aufgeführt werden [43]. Um die richtige Formulierungsart auszuwählen, muss geklärt werden, in welchem Aggregatzustand der Wirkstoff vorliegen soll und wie

die Applikation stattfinden wird. Da für den Erfolg des Pflanzenschutzmittels auch die Wirtschaftlichkeit ein entscheidender Faktor ist, muss das Verfahren zur Herstellung des ausgewählten Formulierungstyps möglichst preiswert und großtechnisch realisierbar sein.

Die folgenden Unterkapitel beschreiben zunächst die Auswahl eines geeigneten Formulierungstyps und die möglichen Bestandteile der Rezeptur. Im Zusammenhang damit werden die gewünschten Eigenschaften des Endprodukts definiert und die wissenschaftlichen Grundlagen erläutert. Abschließend wird die Auswahl eines passenden Produktionsverfahrens durch einen Vergleich etablierter Technologien getroffen.

2.3.1 Auswahl des Formulierungstyps und des Herstellungsverfahrens

2.3.1.1 Anforderungen an die Formulierung

Um den effizientesten Formulierungstyp für Hopfenextrakt auszuwählen, müssen zunächst die Anforderungen an ein biologisches Pflanzenschutzmittel im Hopfenbau und die im Hinblick auf den natürlichen Wirkstoff bestehende Herausforderungen definiert werden. Sie können in fünf Punkte zusammengefasst werden:

- Hohe Wirksamkeit
- Langanhaltende Wirkung
- Gute Lagerstabilität
- Applikation mit den praxisüblichen Feldspritzen, einfache Handhabung des Produkts
- Schutz des Anwenders und der Umwelt

Die Wirksamkeit wird maßgeblich davon bestimmt, wie gut der Wirkstoff vom Schadorganismus aufgenommen werden kann und in welchem Umfang die aktive Substanz am Wirkort verfügbar ist. In der Pharmazie wird dies als Bioverfügbarkeit bezeichnet. Sie lässt sich durch das Verhältnis zwischen absorbierten und insgesamt eingesetzten Wirkstoff definieren und kann deshalb auch auf den Pflanzenschutz übertragen werden. Eine hohe Bioverfügbarkeit liegt bei hoher Löslichkeit in Wasser und guter Permeabilität vor. [44] Im Hinblick auf die Hopfenextrakte ergibt sich daraus ein Widerspruch: Je lipophiler die Wirkstoffe sind, desto stärker ist ihre Wirkung – aber desto geringer ist ihre Löslichkeit (vgl. Kapitel 2.1.3). Da ein Infektionsrisiko durch den Falschen Mehltau nur bei Blattnässe

besteht, ist die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe im Wassertropfen sehr gering. Ziel muss es also sein, die Löslichkeit des Extrakts in Wasser zu erhöhen, ohne an Wirksamkeit einzubüßen.

Gleichzeitig soll die Wirkung möglichst lange anhalten, um kurze Applikationsintervalle zu vermeiden. Die wichtigsten Eigenschaften dafür sind die Stabilität der Wirkstoffe gegen UV-Strahlung und Oxidation und das Anhaften an der Pflanze, um nicht von Regen oder Wind abgetragen zu werden. Einerseits sollten die Bittersäuren und Xanthohumol aufgrund ihres lipophilen Charakters gut an Blättern anhaften, weil diese mit einer Wachsschicht überzogen sind. Andererseits kann die Stabilität der Wirkstoffe nach dem Auftragen auf die Pflanzen als sehr schlecht eingeschätzt werden, da vor allem die Bitterstoffe sehr schnell oxidiert werden, was unter Lichteinstrahlung noch beschleunigt wird [45].

Zudem ist eine ausreichende Lagerstabilität eine wichtige Voraussetzung. Laut den Richtlinien der *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO) und der *World Health Organization* (WHO) sollten nach einer 14-tägigen Lagerung bei 54 °C noch mindestens 95 % des Wirkstoffes intakt sein [46, S. 63]. Auch hier ist die Sensibilität gegen UV-Strahlung und Oxidation problematisch – selbst wenn durch geeignete Lagerungsbedingungen (z.B. im Dunkeln, unter Vakuum) der Abbau verzögert werden könnte. Bei der Auswahl der richtigen Formulierung muss darauf geachtet werden, dass keine Substanzen verwendet werden, die den Abbau beschleunigen könnten. Soll der Wirkstoff in Lösung vorliegen, hängt die Stabilität stark vom Lösungsmittel ab. Laut Literaturangaben ist Colupulon beispielsweise in Methanol weitgehend stabil, während in Cyclohexan eine Halbwertszeit von 16 Stunden gemessen wurde – die Stabilität fällt mit abnehmender Polarität des Lösungsmittels [45, S. 78].

Essenziell für eine Eignung des Produkts als Pflanzenschutzmittel im Hopfenbau ist die Möglichkeit der Applikation mittels praxisüblicher Feldspritzen, da diese zum einen beim Anwender bereits vorhanden sind und zum anderen für die Anwendung im Hopfen optimiert wurden. Die Feldspritzen bestehen aus einem Wassertank, in dem die Pflanzenschutzmittel angerührt werden, einer Düsenvorrichtung und einem Gebläse. Die gemischte Sprühformulierung wird durch einen angelegten Druck von bis zu 50 bar von mehreren Düsen mit einem Bohrungsdurchmesser zwischen 1 mm und 4 mm zerstäubt und mithilfe eines Axialgebläses auf die Pflanzen verteilt (siehe Abbildung 6). Die Voraussetzungen an das Pflanzenschutzmittel sind, dass es gut mit Wasser mischbar ist, im Tank homogen verteilt werden kann und keine größeren Feststoffpartikel enthalten sind, die die

Düsen bzw. den Druckfilter verstopfen könnten. Zudem ist auf eine einfache Handhabung des Produkts, beispielsweise durch gute Dosierbarkeit, Wert zu legen. Aufgrund der sehr niedrigen Wasserlöslichkeiten der Wirkstoffe und der hohen Viskosität des ethanolischen Hopfenextrakts ist ein Einmischen in den Spritztank undenkbar. Die Formulierung muss deshalb Hilfsstoffe enthalten, damit die Wirkstoffe im Wasser gelöst bzw. dispergiert werden können. Außerdem soll der ausgewählte Formulierungstyp die Handhabung des zähen, klebrigen Extrakts erleichtern.



Abbildung 6: Applikation eines Pflanzenschutzmittels mit einer praxisüblichen Feldspritze in einem Hopfengarten

Als letzter Punkt wird der Schutz für den Anwender und die Umwelt aufgeführt. Im Fall von Hopfenextrakt kann davon ausgegangen werden, dass die Wirkstoffe harmlos für Mensch und Umwelt sind. Ganz im Gegenteil: In der Literatur wird von positiven Effekten für den Menschen berichtet, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben wurde. Aufgrund der Instabilität und biologischen Abbaubarkeit sollten die Wirkstoffe zudem eine geringe Persistenz im Boden haben. Auch für Bienen ist der Einsatz von Hopfenextrakt unbedenklich. Die Nutzinsekten können sogar durch Kontakt mit den Hopfenwirkstoffen profitieren, da Lupulone gegen die parasitären Varroamilben (*Varroa destructor*) wirken. [47] Für die endgültige Formulierung werden jedoch weitere Substanzen hinzugefügt, deren Gefahrenpotenzial im Einzelnen und in Kombination zu prüfen ist.

2.3.1.2 Formulierungstypen für Pflanzenschutzmittel

Um die definierten Anforderungen zu erfüllen, muss eine Formulierung entwickelt werden, mit der die beschriebenen Probleme gelöst werden können. Die Auswahl der optimalen Formulierungstechnik ist ausschlaggebend für den Erfolg des Produkts, weshalb in diesem Kapitel die Vor- und Nachteile verschiedener Formulierungstypen erläutert werden sollen. Eine gemeinsame Eigenschaft muss die Mischbarkeit mit Wasser sein, da die Anwendung im Hopfenbau durch die üblichen Applikationsspritzen erfolgen soll. Die möglichen Formulierungstypen lassen sich deshalb in drei Gruppen zusammenfassen:

- Emulsionen (EW), emulgierbare (EC) oder wasserlösliche Konzentrate (SL; „*Soluble Liquid*“)
- Suspensionskonzentrate (SC), Suspoemulsionen (SE) oder Kapselsuspensionen (CS)
- Wasserdispergierbare Pulver (WP; „*Wettable Powder*“), wasserdispergierbare Granulate (WG) und wasserlösliche Pulver (SP; „*Soluble Powder*“)

Bei der ersten Gruppe liegen Wirkstoff und Formulierung als Flüssigkeit vor. Da die Wirkstoffe nahezu unlöslich in Wasser sind, wäre eine Anwendung als EW oder EC denkbar. Dazu werden die Wirkstoffe meist in organischen Lösungsmitteln gelöst und mit einem Emulgatormischung versetzt. Die Verwendung von organischen Lösungsmitteln kann zu ökologischen und toxikologischen Problemen führen.

Die zweite Gruppe beschreibt Wirkstoffe, die fest vorliegen, dem Anwender aber in einer flüssigen Rezeptur bereitgestellt werden. Unter SC versteht man eine hochkonzentrierte Suspension eines festen Wirkstoffs. Da Hopfenextrakt flüssig vorliegt, könnte die Formulierung nur als CS formuliert werden, indem der Wirkstoff auf ein Trägermaterial aufgebracht, oder in eine feste Kapsel eingebaut wird. Bei SE handelt es sich um eine Kombination aus EW und SC (bzw. CS). Bei dieser Gruppe von Formulierungen muss sichergestellt werden, dass die suspendierten Wirkstoffpartikeln nicht nachreifen (durch Ostwald-Reifung) und sich keine Sedimente bilden, die nicht wieder redispersiert werden können.

In der dritten Gruppe der typischen Agroformulierungsarten liegt der Wirkstoff in fester Form als fließfähiges Pulver vor. Damit diese Pulver in Wasser dispergiert werden können, werden Dispergatoren zugesetzt. Problematisch bei WP-Formulierungen kann Staubeentwicklung sein, die durch Granulierung zu WG unterbunden werden kann. Weiterhin müssen eine schlechte Benetzung und das Vorliegen nicht auflösbarer Agglomerate

verhindert werden, da sich sonst die Filter des Applikationsgeräts zusetzen können. Wasserlösliche feste Wirkstoffe können als SP angeboten werden. [48, S. 397 - 406]

Speziell in Bezug auf Hopfenextrakt als biologisches Pflanzenschutzmittel können Emulsionen im Vergleich zu festen Formulierungen einige Nachteile mit sich bringen. Vor allem in Hinblick auf die Wirkstoffstabilität kann die Verwendung von Lösungsmitteln problematisch sein. Nach der Ausbringung des Mittels auf die Pflanzen liegt der Wirkstoff ungeschützt vor, weshalb keine langanhaltende Wirkung zu erwarten ist. Ebenso muss das Aufbringen auf Trägermaterialien kritisch betrachtet werden: Die große Oberfläche solcher Pulver beschleunigt den Stoffaustausch und somit kann die Autoxidation sehr schnell ablaufen. Unter diesen Aspekten ist eine Verkapselung des Wirkstoffes die beste Lösung, da er dann durch ein Hüllmaterial geschützt wird. Unter diesen Umständen sind trockene Formulierungen zu bevorzugen, bei denen die Freisetzung erst bei der Anwendung beginnt. Die geeigneten Formulierungstypen lassen sich damit auf WP oder WG reduzieren. Der zusätzliche Verfahrensschritt der Granulation ist allerdings nur dann sinnvoll, wenn eine gefährliche Staubentwicklung vorliegt. Dies ist der Fall, wenn die Partikeln eingeatmet werden können. Es wird zwischen der einatembaren Fraktion (E-Staub) und alveonengängigen Fraktion (A-Staub) unterschieden. Gemäß DIN EN 481 sind Partikeln unterhalb eines aerodynamischen Durchmessers von 50 µm einatembar und unterhalb von ca. 10 µm alveonengängig [49]. Die obere Grenze wird durch die Applikationsvorrichtung bestimmt, da sich das Pulver nicht in den Sieben und Filtern der Spritze ansammeln soll. Laut Herstellerangaben (Hans Wanner GmbH) beträgt die Maschenweite des Einfüllsiebs 18 mesh (entspricht einer Korngröße von ca. 1 mm) und des Saug- und Druckfilters 50 mesh (Korngröße ca. 297 µm) bzw. 80 mesh (177 µm) bei feinen Düsen. Durch den Größenbereich lässt sich der optimale Formulierungstyp auf Kapseln im Mikrometermaßstab (Mikrokapseln) mit einer Partikelgröße zwischen 10 µm und 177 µm festlegen.

2.3.1.3 Verkapselung von Pflanzenschutzmitteln

Unter Verkapselung versteht man den Prozess, bei dem eine gasförmige, flüssige oder feste Substanz in einen anderen Stoff eingebaut wird, um die Produkteigenschaften zu verbessern. Die Technologie ist gerade im Pflanzenschutz sehr vielversprechend, da der Wirkstoff möglichst effizient genutzt werden soll.

Die wichtigsten Vorteile der Verkapselung sind:

- Kontrollierte Freisetzung
- Erschaffung neuer Produktmerkmale
- Schutz der Wirkstoffe und der Umwelt
- Kombination von Materialien

Eine angemessene Konzentration des Wirkstoffes auf der Pflanze ist ein entscheidender Faktor für die Wirksamkeit eines Pflanzenschutzmittels. Bei unverkapselten Wirkstoffen wird eine hohe initiale Konzentration auf die Pflanzen aufgebracht, um eine langanhaltende Wirkung zu erreichen. Aufgrund von Wind, Regen oder Inaktivierung durch Oxidation oder UV-Einwirkung nimmt die Konzentration sehr schnell ab. Dieses Vorgehen ist nicht nur ineffizient, sondern kann auch dazu führen, dass phytotoxische Konzentrationen erreicht werden, wodurch die Pflanze geschädigt wird. Ziel der Mikroverkapselung ist es, die Wirkstoffmenge auf der Pflanze möglichst konstant zu halten – auf einem Niveau, das für die Bekämpfung des Schädling minimal erforderlich ist. Man spricht von einer kontrollierten Freisetzung. Zudem ist es möglich, dass nur unter bestimmten Bedingungen (beispielsweise bei Nässe) eine Freisetzung erfolgt. [50]

Weiterhin lassen sich durch Mikroverkapselung die Produkteigenschaften gezielt verändern und somit neue Produktmerkmale schaffen. Dazu gehört beispielsweise die Umwandlung einer klebrigen, hochviskosen Flüssigkeit in ein fließfähiges Pulver. Gleichzeitig bietet das Kapselmateriale Schutz vor äußeren Einflüssen wie Oxidation, Licht, Wasser oder Evaporation und ermöglicht eine Kombination aus Materialien, die aufgrund ihrer Mischbarkeit oder Reaktivität inkompatibel wären. Zum Beispiel könnte dank Ko-Verkapselung der lipophile Wirkstoff mit hydrophilen Antioxidantien kombiniert werden. [51]

Es existieren verschiedene Kapseltypen, die je nach Aufbau über unterschiedliche Eigenschaften (v.a. im Hinblick auf die Wirkstofffreisetzung) verfügen. Die wichtigsten Typen sind in Abbildung 7 dargestellt.

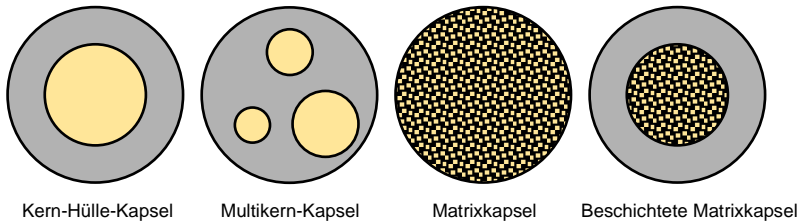


Abbildung 7: Verschiedene Kapseltypen für Pflanzenschutzmittel

Bei der Kern-Hülle-Kapsel ist der Wirkstoff vom Hüllmaterial umschlossen. Liegen mehrere separate Kerne vor, so spricht man von einer Multikern-Kapsel. Bei diesen Formen geschieht die Freisetzung meist schlagartig durch einen Bruch oder ein Auflösen des Hüllmaterials. Ist die Kapselhülle stabil, kann sie auch als Diffusionsbarriere dienen, durch die ein Wirkstoffstrom möglich ist. Bei einem sehr langsamen Herauslösen der Wirkstoffe gleicht die Freisetzungsrates einem Verlauf der nullten Ordnung. Ist der Wirkstoff sehr gut im umgebenden Medium löslich, liegt eine Freisetzungsrates der ersten Ordnung vor, da der Konzentrationsgradient zwischen Kapselinnerem und Umgebung als treibende Kraft mit der Zeit abnimmt. Bei der Matrixkapsel ist der Wirkstoff homogen im Matrixmaterial verteilt. Es handelt sich deshalb nicht um eine Kapsel im klassischen Sinn, da auch an der Partikeloberfläche Wirkstoff vorliegt. Das Herauslösen des Wirkstoffs ist durch eine hohe initiale Freisetzung gekennzeichnet. Je nachdem, ob sich das Matrixmaterial auflöst, wird die weitere Freisetzung durch Erosion oder durch Diffusion (bei beständigem Material) bestimmt. Für die Annahme, dass u.a. das Matrixmaterial nicht aufgelöst wird, dient das Higuchi-Modell zur vereinfachten Beschreibung der Freisetzung. Die Freisetzungsrates folgt einer Abhängigkeit von der Wurzel aus der Zeit. Die Modelle zum zeitlichen Verlauf der Freisetzungsrates sind in Abbildung 8 veranschaulicht. Weiterhin existieren Mischformen, wie eine beschichtete Matrixkapsel, oder auch Kapseln mit mehreren Hüllschichten. Die Freisetzungsrates setzt sich dementsprechend aus den verschiedenen Formen zusammen. [52]

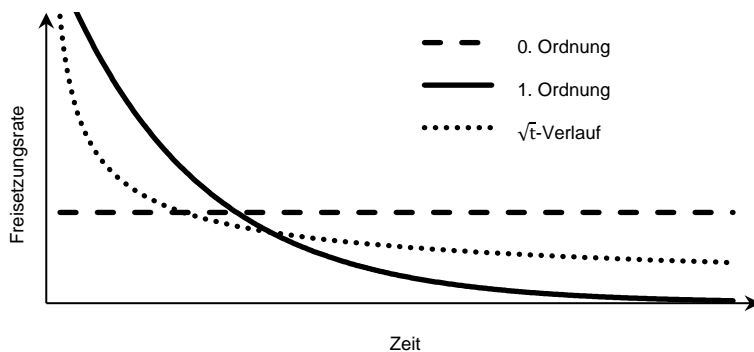


Abbildung 8: Schematischer Verlauf für Freisetzungsraten der nullten und ersten Ordnung sowie in Abhängigkeit von \sqrt{t} .

Im Hinblick auf die Verkapselung von Hopfenextrakt zur Anwendung gegen den Falschen Mehltau ist eine hohe Freisetzung zu Beginn gewünscht, da eine Behandlung nur bei hohem Befallsdruck erfolgt. Um die Dosis anschließend möglichst lange aufrecht zu erhalten, wird eine verlangsamte, aber ausdauernde Freisetzungsraten angestrebt. Wie in Abbildung 8 ersichtlich, erfüllt vor allem der \sqrt{t} -Verlauf diese Anforderungen, weshalb sich die Matrixkapseln am besten für die Anwendung eignen sollten. Diese lassen sich aufgrund des einfachen Aufbaus durch kostengünstige Sprühverfahren herstellen. Komplexere Kapseltypen erfordern aufwendigere Prozesse.

2.3.1.4 Mikroverkapselung durch Sprüherstarrung

Matrixkapseln können anhand von Sprühverfahren produziert werden. Diese Verfahren zeichnen sich v.a. durch niedrige Kosten bei hohen Durchsatzmengen aus [53] und sind deshalb für die Produktion von Pflanzenschutzmitteln sehr gut geeignet. Die Partikelgröße wird durch die Auswahl des Herstellungsprozesses bestimmt. Sie liegt bei Sprühverfahren im Bereich von 3 – 800 μm [51]. Der bekannteste Vertreter ist die Sprühtrocknung, bei welcher die in Lösungsmittel gelösten Kapselkomponenten durch eine Düse in Tropfen zerstäubt werden und nach Verdampfen des Lösungsmittels die festen Bestandteile zurückbleiben [54]. Nachteil dieses Verfahrens ist, dass je nach Löslichkeit der Kapselkomponenten sehr viel Lösungsmittel verwendet werden muss. Dadurch kann es zu unvollständigem Verdampfen kommen und unerwünschtes Lösungsmittel kann im Produkt zurückbleiben. Eine bessere Alternative ist deshalb die Sprüherstarrung, bei welcher die Wirkstoffe in eine Schmelze

des Matrixmaterials eingerührt werden. Das Gemisch wird anschließend durch eine Düse zerstäubt und durch das Abkühlen auf Temperaturen unterhalb des Schmelzpunkts erstarren die Tröpfchen zu Matrixpartikeln. Dies hat den Vorteil, dass ohne Lösungsmittel gearbeitet werden kann und ein höherer Durchsatz möglich ist. Die Prozesstemperatur hängt vom Schmelzpunkt des Matrixmaterials ab und wird im Normalfall auf ca. 10 °C über der Schmelztemperatur festgelegt. [55] Als Matrixmaterialien können Fette, Wachse, Alkohole oder Polymere mit niedrigem Schmelzpunkt dienen [56]. Gerade im Hinblick auf den biologischen Pflanzenschutz bieten sich deshalb nachwachsende und biologisch abbaubare Matrixmaterialien, wie pflanzliche Fette oder Wachse, an. Bei der Sprüherstarrung handelt es sich deshalb um das billigste Verkapselungsverfahren, mit dem auch sensitive Wirkstoffe verkapselt werden können und das durch den Verzicht auf Lösungsmittel sehr umweltfreundlich ist.

Das Herzstück einer Sprüherstarrungs-Anlage ist die Düse, die für das Zerstäuben der Schmelze verantwortlich ist. Unter Zerstäuben wird das Zerteilen von Flüssigkeiten in Einzeltropfen verstanden [57, S. 1]. Zerstäuber werden nach Art ihrer Energiezufuhr in verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese sind Einstoffdüsen (Druckdüsen), Zweistoffdüsen (pneumatische Zerstäuber), Rotationszerstäuber, Ultraschallzerstäuber und Sonderzerstäubungsverfahren wie z.B. elektrostatisches Zerstäuben [57, S. 58]. Zur Zerstäubung ist prinzipiell eine hohe Relativgeschwindigkeit zwischen dem zu zerstäubenden Fluid und dem umgebenden Medium notwendig [58, S. 3]. Für die Herstellung der Mikrokapseln mittels Sprüherstarrung kommen entweder Einstoff- oder Zweistoffdüsen infrage. Der wesentliche Unterschied zwischen den beiden Typen liegt darin, dass die zur Zerstäubung benötigte Beschleunigung des Fluids bei Einstoffdüsen durch das Passieren einer Verengung bei hoher Druckdifferenz stattfindet, während bei Zweistoffdüsen ein Zerstäubungs-gas verwendet wird. Charakteristisch für Einstoffdüsen ist deshalb ein hoher Druck bei einer kleinen Austrittsöffnung. Ein Vorteil der Zweistoffdüse ist, dass der Austrittsquerschnitt größer gewählt werden kann, weil der Energieeintrag zur Zerstäubung des Fluids durch den Gasstrom erfolgt. Die Verstopfungsgefahr durch Agglomerate oder Verunreinigungen ist dadurch verringert, was das Versprühen von Suspensionen und hochviskosen Materialien erlaubt [59]. Darüber hinaus ist die Austritts-geschwindigkeit des Fluids bei der Einstoffdüse höher, weshalb ein längerer Sprühturm benötigt wird [60].

Im Vergleich zur Druckdüse lässt sich allerdings auch ein Nachteil der Zweistoffdüse festhalten: Ein Zerstäubungsgas wird benötigt, von dessen

Energie nur ein geringer Anteil zur Zerstäubung genutzt wird [59]. Bei großen Durchsatzmengen können deshalb hohe Kosten für die Bereitstellung des Zerstäubungsgases anfallen. Zur Formulierungsentwicklung des Pflanzenschutzmittels sind Zweistoffdüsen dennoch geeigneter, da sie deutlich flexibler im Hinblick auf die Rezeptur sind. Außerdem können die Kosten des Zerstäubungsgases durch die Verwendung von Druckluft minimiert werden.

Zweistoffdüsen werden grundsätzlich in zwei Bauformen unterteilt, je nachdem, an welcher Stelle Fluid und Zerstäubungsgas aufeinandertreffen. Es wird zwischen außen- und innenmischenden Düsen unterschieden.

Wie die Namen andeuten, trifft der Gasstrom bei der außenmischenden Düse erst nach dem Austritt aus der Düsenöffnung auf den Fluidstrom, während die innenmischende Bauform eine Mischkammer besitzt. Bei der Innenmischung ist zwar ein geringerer Gasdruck erforderlich, jedoch ist die Partikelgrößenverteilung deutlich breiter als bei der Außenmischung. Bei dieser tritt der Gasstrom mit einer sehr hohen Relativgeschwindigkeit aus, weshalb (ähnlich zur Druckdüse) hohe vertikale Geschwindigkeiten der Tropfen entstehen können. Um dies zu verhindern, wird der Gasstrom durch einen geeigneten Eintritt oder durch Drall-Vorrichtungen im Düsenkörper in Rotation versetzt. Dadurch werden der Sprühwinkel vergrößert und die Falltiefe der Tropfen verringert. [59]

Sind feste Bestandteile im Fluid, kommt es bei der innenmischenden Düse zu starker Erosion in der Mischkammer, was die Lebensdauer deutlich verkürzt. Der entscheidende Vorteil der außenmischenden Düse ist, dass die Zerstäubung besser gesteuert werden kann, da Gas- und Fluidstrom unabhängig voneinander variiert werden können [61]. Auch für die Entwicklung eines mikroverkapselten Pflanzenschutzmittels eignet sich die außenmischende Bauform aufgrund der höheren Flexibilität und Kontrolle besser.

2.3.2 Steuerung der Produkteigenschaften mittels Mikroverkapselung

Die Mikroverkapselung wurde als Formulierungstechnik gewählt, da dadurch die Eigenschaften des Produkts gezielt verändert werden können. Im Folgenden werden die Grundlagen beschrieben, wie die relevanten Eigenschaften optimiert werden können, damit die in Kapitel 2.3.1.1 aufgeführten Anforderungen erfüllt werden können.

2.3.2.1 Produkthandling

Unter dem Begriff Produkthandling sind die Faktoren zur Einsetzbarkeit und einfachen Handhabung zusammengefasst. Die Mikrokapseln müssen fließfähig, in Wasser dispergierbar und stabil in wässriger Suspension sein.

Die Fließfähigkeit wird durch die Kohäsion („Klebrigkeit“) der Partikeln beeinflusst. Allgemeine Einflussfaktoren sind die Partikelgröße (oberhalb von 200 µm können Pulver als fließfähig betrachtet werden) und die Feuchtigkeit. [62] Speziell über die Fließeigenschaften von Matrixkapseln, welche durch Sprüherstarrung produziert wurden, ist in der Literatur wenig zu finden. Im Rahmen dieser Arbeit sollen deshalb die Faktoren identifiziert werden, welche die Rieselfähigkeit der hergestellten Partikeln bestimmen. Da alle verwendeten Stoffe gleichmäßig über die Kapsel verteilt sind, liegen sie zu einem Teil an der Partikeloberfläche vor. Dadurch wird die Klebrigkeit von allen eingemischten Substanzen bestimmt.

Das Pulver muss vor der Anwendung in Wasser dispergiert werden. Unter Dispergieren wird das Feinverteilen von Partikeln in einem Fluid verstanden [63, S.240]. Dies ist für das Pflanzenschutzmittel wichtig, damit es möglichst gleichmäßig im Feld ausgebracht werden kann. Grundlage dafür ist, dass das Pulver homogen in der Spritzbrühe verteilt und Agglomerate zerkleinert werden. Große Agglomerate mit einem Durchmesser von mehr als 1 mm würden bereits im Einfüllsieb des Spritztanks zurückgehalten werden. Der Dispergierprozess setzt sich aus drei Stufen zusammen: Benetzung des Pulvers, Desagglomerierung und Stabilisierung der Partikeln [48, S.134]. Die ersten beiden Stufen werden unmittelbar durch die Benetzungsrate beeinflusst. Aufgrund des lipophilen Charakters der Mikrokapseln ist das Pulver mit Wasser generell sehr schlecht benetzbar. Die Abhängigkeit der Benetzungsgeschwindigkeit von den relevanten Einflussgrößen ist in der Washburn-Gleichung gegeben [48, S. 44]:

$$\frac{dl}{dt} = \frac{r \cdot \gamma_{LV} \cdot \cos\theta_K}{4 \cdot \eta \cdot l} \quad (1)$$

Die Benetzungsrate steigt mit dem Porenradius r , der unter Einbezug der Porosität auch mit der Partikelgröße ersetzt werden kann. Eine hohe Grenzflächenspannung γ_{LV} und ein geringer Kontaktwinkel θ_K führen ebenfalls zur beschleunigten Benetzung. Eine hohe Viskosität η und

Eindringtiefe l verringert die Geschwindigkeit. Um die Benetzungsgeschwindigkeit zu erhöhen kann durch sogenannte Netzmittel der Kontaktwinkel verringert werden. Dieser besitzt den größten Einfluss auf die Benetzungsrate. Bei Netzmitteln handelt es sich um oberflächenaktive Substanzen (Tenside), die sowohl hydrophile- als auch lipophile Gruppen besitzen. Grundsätzlich setzen sie die Grenzflächenspannung herab, wobei gleichzeitig der Kontaktwinkel verringert wird. Ziel ist es deshalb, einen möglichst kleinen Kontaktwinkel zu erreichen, ohne die Grenzflächenspannung zu stark zu reduzieren [48, S. 44].

Als dritte Stufe muss die Dispersion stabilisiert werden, da gemäß der DLVO-Theorie (als Abkürzung für die Wissenschaftler Derjaguin, Landau, Vervey und Overbeek) Koagulation antreibende Van-der-Waals-Kräfte vorliegen, welche von abstoßenden Kräften übertroffen werden müssen [48, S. 164]. Unter Dispersionsstabilisierung wird das Verhindern der Reagglomeration verstanden. Die Stabilisierung kann durch drei Mechanismen erfolgen [48, S. 147]:

- Elektrostatische Abstoßung
- Sterische Hinderung
- Kombination aus elektrostatischer Abstoßung und sterischer Hinderung

Die elektrostatische Stabilisierung basiert auf der Abstoßung zwischen zwei Teilchen gleicher Ladung. Da ungeladene Materialien zur Kapselherstellung verwendet werden, sind vor allem die letzteren beiden Mechanismen entscheidend. Allerdings können auch unpolare Feststoffe durch Adsorption von Ionen eine Ladung erhalten [48, S. 147]. Die sterische Hinderung erfolgt durch die Verankerung von langkettigen, voluminösen Molekülen auf der Partikeloberfläche, die dadurch ein Aufeinandertreffen der Partikeln verhindern. Tragen die angelagerten Moleküle gleichwertig geladene Reste, kommt es zu einer Kombination zwischen elektrostatischer und sterischer Stabilisierung. Auch bei dieser Stufe dienen Tenside, sogenannte Dispergiermittel, zum Erreichen der gewünschten Eigenschaft. Der Unterschied zwischen Netz- und Dispergiermittel liegt in der Kettenlänge der lipophilen Gruppe. Netzmittel sind generell kurzkettiger und deshalb mobiler zur Beschleunigung der Benetzung, während Dispergiermittel langkettiger und somit zur Stabilisierung der Partikeln besser geeignet sind [48, S. 147 ff.]. Im Fall der Mikrokapseln binden die lipophilen Teile der Dispergiermittel an die Kapseloberfläche, während die hydrophilen Gruppen in das umgebende Medium hinaus-

ragen. Ist die Kopfgruppe geladen, kann es zusätzlich zu Abstoßungseffekten kommen.

Als letzte Eigenschaft der Kategorie Produkthandling soll die Suspensionsstabilität betrachtet werden. Diese gilt als Maß dafür, wie stabil die Partikeln im Wassertank in Schwebelage gehalten werden. Aufschwimmen oder Sedimentation der Kapseln muss verhindert werden. Um die Bewegung von Partikeln in einem Fluid zu beschreiben kann die Sinkgeschwindigkeit der Mikrokapseln verwendet werden. Unter der Annahme runder Partikeln im Stokesbereich kann sie mit folgender Gleichung ausgedrückt werden [63, S. 113]:

$$w_{sSt} = \frac{\rho_p - \rho_f}{18 \cdot \eta} \cdot g \cdot x^2 \quad (2)$$

Dabei beschreibt w_{sSt} die Stokes'sche Sinkgeschwindigkeit, ρ_p und ρ_f die Partikel- bzw. Fluidichte, η die Viskosität des Fluids, g die Erdbeschleunigung und x den Partikeldurchmesser. Unter der Annahme, dass alle Kapseln die gleiche Dichte besitzen und die Viskosität konstant ist, hängt die Absinkgeschwindigkeit einzig von der Partikelgröße ab. Große Partikeln sinken deshalb schneller ab als kleine. Weiterhin kann aus der Formel abgeleitet werden, dass für eine stabile Suspension die Dichte der Kapseln möglichst der Dichte von Wasser entsprechen sollte.

2.3.2.2 Wirkstofffreisetzung in Wasser und Bioverfügbarkeit

Eine Infektion der Pflanzen durch den Falschen Mehltau tritt ausschließlich bei Nässe auf. Deshalb ist es wichtig, dass die Wirkstoffe freigesetzt werden, sobald die Mikrokapseln in Berührung mit Wasser kommen. Um die ideal angestrebte Freisetzungskinetik (vgl. Kap. 2.3.1.3) zu erreichen, müssen Maßnahmen zum kontrollierten Herauslösen der Wirkstoffe getroffen werden. Der sehr gut fettlösliche Hopfenextrakt wird fest im Matrixmaterial gebunden. Die treibende Kraft zur Wirkstofffreisetzung ist deren Löslichkeit in Wasser, weshalb eine sehr geringe Freisetzungsrates zu erwarten ist. Für eine hohe Bioverfügbarkeit müssen die Wirkstoffe in Lösung vorliegen, aber sie dürfen ihren lipophilen Charakter und die damit verbundene Permeabilität nicht verlieren.

Generell hängt die Freisetzung von sehr vielen Faktoren ab. Dazu gehören die Materialeigenschaften des Hüllmaterials (Dichte, Kristallinität, Löslichkeit, Ausrichtung, Quervernetzung, etc.) die Kapsel-eigenschaften (Partikelgröße, Wirkstoffbeladung, etc.) und äußere Einflüsse (Temperatur, pH-Wert, Feuchte, mechanische Kräfte, osmotischer Druck, etc.) [51]. Im

Rahmen der Formulierungsentwicklung kann die Freisetzung durch die Auswahl des Hüllmaterials beeinflusst werden. Weiterhin können zur Erhöhung der Löslichkeit der Wirkstoffe sog. Löslichkeitsvermittler in die Kapsel integriert werden. Auch hierzu eignen sich Tenside, da sie durch ihre Amphiphilie Vermittler zwischen polaren und unpolaren Medien darstellen.

2.3.2.3 Partikelform und -größe bzw. -größenverteilung

Die Partikelform und -größe wird durch den Herstellungsprozess gesteuert. Nach der Zerteilung des Flüssigkeitsstrahls bewirkt die Oberflächenspannung die Bildung kugelförmiger Tropfen, da die Form mit minimaler Oberflächenenergie angestrebt wird [58, S. 17]. Beim Sprüherstarrungsprozess gilt allerdings zu beachten, dass der Tropfen nur fließfähig ist, solange die Schmelztemperatur nicht unterschritten wird. Dies bedeutet, dass Partikeln eventuell „eingefroren“ werden können, noch bevor sie die Kugelform annehmen. Zusätzlich kann die Form durch das Zusammentreffen von teilweise erstarrten Tropfen und der Bildung von Feststoffbrücken beeinflusst werden. Auch Kristallisationsvorgänge können die Form und Oberfläche der Kapseln verändern. Auf die kristallinen Eigenschaften von Lipiden wird in Kapitel 2.3.4 näher eingegangen.

Die für die Tropengröße entscheidenden Einflussgrößen sind die Art und Geometrie des Zerstäubers, die physikalischen Eigenschaften des zu zerstäubenden Fluids und die Eigenschaften des Mediums, in welches gesprüht wird [58, S. 6]. Im Prozess wird eine außenmischende Zweistoffdüse verwendet (vgl. Kap. 2.3.1.4). Bei diesem Zerstäubungstyp liegt ein komplexer Zusammenhang zwischen der Partikelgröße und den Prozess- bzw. Stoffparametern vor. Dieser ist noch nicht hinreichend verstanden, um allgemein gültige Modelle zur Berechnung der Partikelgröße aufstellen zu können. In der Literatur sind mehrere empirische Berechnungsformeln zu finden, deren Ergebnisse sich jedoch oft deutlich voneinander unterscheiden, da sie nur unter speziellen Bedingungen gültig sind. Die folgenden qualitativen Zusammenhänge konnten auf Basis von verschiedenen Forschungsarbeiten dennoch als allgemein gültig festgestellt werden: [61]

- Die Massenströme des Zerstäubungsgases und der Schmelze beeinflussen die Tropfengröße unmittelbar. Ein höherer Gasstrom verringert die Größe, während bei höherem Fluidstrom größere Tropfen entstehen.
- Die relevanten Eigenschaften der Schmelze sind Viskosität, Dichte und Oberflächenspannung. Sowohl eine Erhöhung der Viskosität als auch der Oberflächenspannung führen zu größeren Kapseln. Der Einfluss der Dichte ist komplexer und kann unter bestimmten Umständen zur Vergrößerung oder zur Verkleinerung der Tropfengröße führen. Allerdings ist der Einfluss der Dichte vergleichsweise gering.
- Die wichtigste Einflussgröße auf die Partikelgröße ist die Austrittsgeschwindigkeit des Zerstäubungsgases. Bei niedrigviskosen Schmelzen verhält sich die Partikelgröße annähernd umgekehrt proportional zur Geschwindigkeit der Luft. Bei höherer Temperatur der Zerstäubungsluft steigt die Tropfengröße.

Die durch Zweistoffdüsen entstehenden Partikeln variieren in ihrer Größe sehr stark aufgrund der heterogenen Natur des Zerstäubungsprozesses [61].

2.3.2.4 Wirkstoffstabilität

Bereits in Kapitel 2.1.3 wurde der autoxidative Abbau und die Isomerisierung der Hopfenwirkstoffe durch Kontakt mit Sauerstoff bzw. durch Lichteinwirkung erwähnt. Die Mikroverkapselung wurde als Formulierungstyp u.a. deshalb gewählt, um den Substanzen eine langanhaltende Stabilität zu verleihen. Da jedoch bei Matrixkapseln auch Wirkstoff an der Oberfläche vorliegt, muss geprüft werden, ob und wie ein zufriedenstellender Schutz erreicht werden kann.

Die Geschwindigkeit des oxidativen Abbaus der Wirkstoffe ist generell abhängig von der Konzentration und Wirksamkeit von Pro- und Antioxidantien, dem Sauerstoff-Partialdruck, der mit Sauerstoff in Berührung kommenden Oberfläche und von den Lagerungsbedingungen (Temperatur, Licht, Wassergehalt). Gestartet wird die Oxidation durch die Bildung von Peroxy- ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxy- ($\text{RO}\cdot$) oder Alkyl-Radikalen ($\text{R}\cdot$), durch die eine Radikalkettenreaktion initiiert wird. Die Elementarschritte der Kettenreaktion sind in Abbildung 9 aufgezeigt. [64, S. 194 f.]

Kettenwachstum:	(1)	$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot$	
	(2)	$ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$	
	(3)	$RO\cdot + RH \rightarrow ROH + R\cdot$	
Kettenverzweigung:	(4)	$ROOH \rightarrow RO\cdot + \cdot OH$	
	(5)	$2 ROOH \rightarrow ROO\cdot + RO\cdot + H_2O$	
Kettenabbruch:	(6)	$2 R\cdot \rightarrow$	} stabile Endprodukte
	(7)	$R\cdot + ROO\cdot \rightarrow$	
	(8)	$2 ROO\cdot \rightarrow$	

Abbildung 9: Elementarschritte der Autoxidation von organischen Substanzen

Von besonderer Bedeutung sind die möglichen Kettenverzweigungen (Schritt 4), da durch den Zerfall von Hyperperoxiden (ROOH) je zwei Radikale entstehen, die sich in einer Kettenreaktion mit Sauerstoff vereinen und damit den oxidativen Abbau weiter vorantreiben. Durch Vereinigung zweier Radikale (Schritte 6-8) kann es zu einem geringen Maß zum Abbruch der Reaktion kommen. [48, S. 380 f.] Die Autoxidation kann durch Ausschluss von Sauerstoff (z.B. durch Vakuumverpackung), Lagerung bei tiefer Temperatur in Dunkelheit oder durch den Zusatz von Antioxidantien gehemmt bzw. verhindert werden [64, S. 219]. Deren Aufgabe ist es, Radikale abzufangen und den Kreislauf der Oxidation zu unterbrechen. Wichtig in mehrphasigen Systemen ist, dass die Antioxidantien in derselben Phase wie die zu schützenden Substanzen zu finden sind. [48, S. 380 f.] Das Abfangen von Radikalen geschieht in der Regel durch phenolische OH-Gruppen der Antioxidantien, welche nach H-Abstraktion resonanz-stabilisierte Phenoxyradikale bilden. Antioxidationsmittel wirken jedoch nicht nur als Radikalfänger, sondern können auch Hydroperoxide zu Hydroxyverbindungen reduzieren. [64, S. 218]

Die Verkapselung kann zusätzlich dazu dienen, die Wirkstoffe von UV-Strahlung abzuschirmen. Zum einen ist die energiereiche Strahlung für die Entstehung von Radikalen, welche die Oxidationskettenreaktion starten, verantwortlich. Zum anderen kann sie eine Reaktion der Inhaltsstoffe, wie die Isomerisierung der α -Säuren, bewirken. Ungesättigte Fettsäuren absorbieren aufgrund der isolierten cis-Doppelbindungen Licht einer Wellenlänge um 190 nm [64, S. 170]. Da aufgrund des Schmelzbereichs aber vor allem gehärtete Fette als Matrixmaterialien infrage kommen, ist keine Absorption zu erwarten. Dies konnte von M. Pemsel bei der Verkapselung eines Granulosevirus nachgewiesen werden [65, S. 189]. Um dieses Problem zu lösen, können Substanzen zum UV-Schutz in das Matrixmaterial

integriert werden. Diese sogenannten UV-Stabilisatoren wirken entweder als UV-Absorber, Radikalfänger (ähnlich zu Antioxidantien), oder UV-Quencher (leiten die durch Strahlung absorbierte Energie in Form von Wärme oder Fluor- bzw. Phosphoreszenzstrahlung ab) [66, S. 110-117].

Um die Wirksamkeit der Hopfenextrakte zu erhalten, muss geprüft werden, ob Antioxidantien, UV-Stabilisatoren oder eine Kombination beider in die Kapsel integriert werden müssen.

2.3.2.5 Benetzung der Pflanzen und Haftverhalten

Ein weiterer wichtiger Faktor, der die Effizienz eines Pflanzschutzmittels beeinflusst, ist die gleichmäßige Verteilung auf den Pflanzen und das Anhaften auf der Pflanzenoberfläche. Die Ausbringung erfolgt mit einer Sprühvorrichtung, welche die Kapselsuspension in kleine Tropfen zerteilt und auf die Hopfenpflanzen bläst. Der Aufbau der Apparatur ist so ausgelegt, dass die Pflanzen komplett benetzt werden bei möglichst geringer Abdrift. Entscheidend für die Formulierungsentwicklung ist der Kontakt zwischen den pflanzenschutzmittelhaltigen Tropfen und der Blattoberfläche. Ziel ist es, eine möglichst hohe Retention zu erzielen.

Die äußere Schutzschicht einer Pflanze ist die Epidermis. Sie ist mit einem Wachsfilm überzogen, was die Benetzung mit einer wässrigen Spritzbrühe erschwert. Zusätzlich muss der Einschlag der Tropfen auf den Blättern beachtet werden. Je höher die Auftrittsgeschwindigkeit und die Rauigkeit der Blattoberfläche ist, desto wahrscheinlicher ist ein Abprallen oder Zerspringen der Tropfen. [67] Hopfenblätter besitzen eine ausgeprägte dreidimensionale Struktur (Rauigkeit), die aufgrund von Aderung, feinen Härchen, haarähnlichen Trichomen und der Beschaffenheit der Kutikula zustande kommt [68]. Eine hohe Viskosität würde ein Abprallen der Tropfen verringern, da die Aufprallenergie durch die Tropfenverformung aufgenommen werden kann. Allerdings sind viskose Spritzbrühen bei der Applikation impraktikabel, da sie eine feine Zerstäubung verhindert. Wichtiger ist deshalb der Einfluss der Grenzflächenspannung, die durch Tenside in der Spritzbrühe herabgesetzt werden kann. Eine verringerte Oberflächenspannung führt zu geringerem Abprallen, aber auch zu einem Zerspringen der Tropfen. [67] Weiterhin können die Tenside zum Spreiten der Tropfen auf der Blattoberfläche beitragen. Das bedeutet, dass sich der Tropfen durch eine bessere Benetzung auf dem Blatt ausbreitet und trockene Stellen vermieden werden. [69]

Nach dem Aufbringen der Kapselsuspension auf die Blätter verdunstet das Wasser und es bleiben die nicht flüchtigen Bestandteile zurück. Diese sollen möglichst stark auf der Blattoberfläche anhaften. Die relevanten

Haftkräfte können in Form von Festkörperbrücken oder Anziehungskräften auftreten. Festkörperbrücken entstehen durch Sinter- oder Schmelzbrücken (ab einer Temperatur von ca. 60 % der Schmelztemperatur) oder durch das Trocknen von feuchten Pulvern, wenn gelöste Komponenten an der Partikeloberfläche auskristallisieren. Zu den Anziehungskräften gehören die van-der-Waals-Kräfte und elektrostatische Anziehungskräfte. Auch isolierende Partikeln wie die Fettkapseln können z.B. durch Reibung eine Überschussladung erhalten. Entscheidender sind jedoch die van-der-Waals-Kräfte, welche proportional mit der Partikelgröße (x) steigen. Da die entgegenwirkenden Kräfte, wie Schwerkraft, oder Widerstandskraft (z.B. durch Wind oder Niederschlag) im Verhältnis x^3 bzw. x^2 stehen, werden große Partikeln leichter abgelöst als kleine. Festkörperbrücken sind generell stärker als Anziehungskräfte. Auskristallisierte Materialien können aber bei Feuchtigkeit wieder aufgelöst und die Haftung dadurch aufgehoben werden. [63, S. 73-77]

Zur Verbesserung der Retention können zusätzlich Haftmittel in die Spritzbrühe gemischt werden. Zu diesen Adjuvanten gehören Polymere, Acryllatex, epoxidierte Samenöle und Akyphenol-Kondensate (Harze). Sie unterstützen die Ablagerung auf dem Blatt, indem sie die Viskosität erhöhen und das Abprallen der Kapselsuspension verhindern. Manche Haftmittel bilden zudem eine hydrophobe Schicht auf der Blattoberfläche, um die Wirkstoffe vor Abwaschen zu schützen. [69]

2.3.3 Tenside in Formulierungen

Produkthandling, Wirkstofffreisetzung, Bioverfügbarkeit und Retention der Kapseln auf der Blattoberfläche können durch den Einsatz von Tensiden verbessert werden. In diesem Kapitel werden deshalb die dazu benötigten Grundlagen kurz beschrieben.

Tenside sind amphiphile Substanzen: Sie sind sowohl in Wasser als auch in Öl löslich sind. Die Moleküle besitzen in der Regel eine Kohlenwasserstoff-Kette, welche für die Öllöslichkeit verantwortlich ist, und eine polare Kopfgruppe. Sie werden auf Basis ihrer polaren Gruppe in die Kategorien anionische, kationische, zwitterionische und nichtionische Tenside eingeteilt. Zur Quantifizierung der Tensideigenschaften wird meist der HLB-Wert (*hydrophilic-lipophilic balance*) nach W. C. Griffin verwendet. Er lässt sich aus dem Verhältnis der molaren Masse des lipophilen Rests (M_l) zum Molekulargewicht des gesamten Tensids (M_g) gemäß Gleichung 3 berechnen:

$$HLB = 20 \cdot \left(1 - \frac{M_l}{M_g}\right) \quad (3)$$

Der Faktor 20 wurde zur Skalierung gewählt, sodass sich Tenside in eine Skala von 1 bis 20 einteilen lassen. Der HLB-Wert eignet sich zur groben Unterscheidung der Tenside bezüglich ihrer möglichen Anwendung und Mischbarkeit mit Wasser. Tabelle 2 bietet einen Überblick über diese Einteilungen. [70, S. 381-386]

Tabelle 2: Einteilung und Verwendung von Tensiden in Abhängigkeit des HLB-Werts

HLB-Wert	Verwendung	Mischbarkeit mit Wasser
1,5-3	Antischaummittel	Unlöslich
3-8	Wasser/Öl-Emulgator	Milchig beim Rühren
7-9	Netzmittel	
8-18	Öl/Wasser-Emulgator	Stabile Emulsion
13-15	Waschaktive Tenside	Klare Emulsion/Lösung
12-18	Lösungsvermittler für wässrige Systeme	Klare Emulsion/Lösung

Tenside in verdünnten Lösungen verhalten sich wie normale Moleküle. Ab einer bestimmten Konzentration ändern sich einige physikalische Eigenschaften, wie die Oberflächenspannung, abrupt. Bei niedriger Konzentration liegen die Tensidmoleküle als Monomere in Lösung vor und sie lagern sich zunächst an der Grenzfläche (z.B. Wasser/Luft) an. Die polare Kopfgruppe orientiert sich in Richtung Wasser und der lipophile Rest ragt in die Luft hinaus. Die abrupten Veränderungen treten ab einem Überschreiten der kritischen Mizellbildungskonzentration (CMC für *critical micelle concentration*) ein, da sich die Tensidmonomere spontan zu Aggregaten (Mizellen) zusammenlagern. In Wasser ist dabei der lipophile Rest ins Innere der Mizelle gerichtet. Je nach dreidimensionaler Struktur des Tensids bilden sich kugel-, stäbchen- oder diskförmige Mizellen. Werden Tenside in einer lipophilen Phase gelöst, entstehen sogenannte inverse Mizellen, bei denen die hydrophile Kopfgruppe nach innen gerichtet ist. Die Aggregate können auch aus unterschiedlichen Tensiden erzeugt werden, solange die ins Innere der Mizelle ragenden Reste miteinander mischbar sind. [70, S. 400-407]

Außerdem sind Mizellen dazu in der Lage, andere Moleküle in sich aufzunehmen [70, S. 407]. Somit können lipophile Substanzen wie die Hopfenwirkstoffe in Mizellen eingebaut werden, wodurch eine höhere Löslichkeit erzielt wird. Dieses Verhalten wird als solubilisierende Wirkung bezeichnet. Sie ist bei nichtionischen Tensiden etwa um den Faktor zehn höher als bei anionischen. Je länger die lipophile Kette in einer homologen Reihe eines Tensids, desto höher ist die freie Solubilisierungsenergie. [48, S. 50 f.] Durch den Einschluss in Mizellen ist die Wirksamkeit der Hopfeninhaltsstoffe unmittelbar mit dem Tensid verknüpft. Da die Wirkstoffe in die Zelle aufgenommen werden müssen, darf die Permeabilität durch die Mizellen nicht verringert werden.

Aufgrund der höheren Solubilisierung sind nichtionische Tenside für eine starke Freisetzung der Wirkstoffe besser geeignet. Hinzu kommt, dass manche Tenside schwer biologisch abbaubar sind und fischtoxisch wirken können. Gerade im biologischen Pflanzenschutz sollte deshalb auf den Einsatz unbedenklicher Substanzen geachtet werden. Dazu gehören beispielsweise nichtionische Tenside auf Saccharid-Basis. [48, S. 34] Auch im Hinblick auf die Benetzungsrate der Partikeln haben ungeladene Tenside einen Vorteil, da die Oberflächenspannung abnimmt, je hydrophober das Molekül ist [71, S. 55 f.]. Dennoch könnten sich geladene Tenside zum Beispiel bei der Stabilisierung der Dispersion als hilfreich erweisen, weil die polaren Gruppen zu starken elektrostatischen Abstoßungseffekten führen können [48, S. 84].

Im Rahmen der Mikroverkapselung gilt zu beachten, dass Tenside entweder extern in die Spritzbrühe oder in die Kapsel direkt eingemischt werden können. Dadurch ergeben sich große Unterschiede, in welcher Form die Tenside vorliegen. Ist das Tensid fettlöslich, bilden sich beim Einmischen in die Kapselmatrix inverse Mizellen. In dem Fall muss bei Kontakt mit Wasser eine Freisetzung erfolgen, da nur dann eine Benetzung der Kapseln, Stabilisierung der Suspension, Solubilisierung der Wirkstoffe und Verbesserung der Retention auf dem Blatt möglich ist. Nach der Freisetzung der Tenside muss eine Umlagerung zur „normalen“ Mizellform stattfinden, da sich die umgebende Phase umkehrt. Aufgrund der sehr vielseitigen Anforderungen wird ein Tensid benötigt, welches sowohl mit Fett als auch mit Wasser mischbar ist. Ein passendes Tensid bzw. eine Kombination aus mehreren Tensiden sowie die optimale Anwendungsform muss deshalb experimentell gefunden werden.

2.3.4 Grundlagen zu Lipidmikropartikeln

Für die Mikroverkapselung von Hopfenextrakt für den biologischen Pflanzenschutz bieten sich in erster Linie Lipide an. Sie sind dank ihres Schmelzbereichs für die Sprüherstarrung mit empfindlichen Wirkstoffen geeignet und die Verwendung von nachwachsenden, unbedenklichen Rohstoffen steht im Einklang mit dem Nachhaltigkeitsgedanken der biologischen Landwirtschaft. Durch die Auswahl dieser Form der Formulierung können die Hopfenextrakt-Kapseln den festen Lipidmikropartikeln (SLP, engl. *Solid Lipid Particles*) zugeordnet werden. Bei dieser Gruppe bilden Lipide als Matrixmaterial den Hauptbestandteil der Kapsel, weshalb sie die physikalischen und chemischen Produkteigenschaften maßgeblich bestimmen. Um die Relation zwischen Lipid und Partikeleigenschaften nachvollziehen zu können, werden in diesem Kapitel die Grundlagen über Aufbau und Struktur der Stoffgruppe zusammengefasst.

2.3.4.1 Chemische Grundlagen der Lipide

Den Lipiden kann eine große Gruppe von Verbindungen zugeordnet werden. Dazu gehören einfache, aber auch aus mehreren Bausteinen bestehende Substanzen. Sie lassen sich in einfache Lipide und Acyllipide unterscheiden. Zu den einfachen Lipiden zählen etwa freie Fettsäuren, Isoprenoid-Lipide und Tocopherole. Die wichtigsten Vertreter der Acyllipide sind Mono-, Di- und Triacylglyceride, die aus einem Glycerin-Molekül und ein bis drei Fettsäuren zusammengesetzt sind. Es sind vor allem die Triacylglyceride (kurz TAG), welche in tierischen Geweben und Organen bestimmter Pflanzen als Speicherstoff zu sehr großen Anteilen vorkommen. Aufgrund ihrer hohen Verfügbarkeit sind sie für technische Anwendungen von besonderer Bedeutung. Weitere Acyllipide sind Wachse, Phospholipide, Glykolipide, Diollipide und Sterinester. [64, S. 161]

Eine entscheidende Eigenschaft für die Eignung eines Lipids als Matrixmaterial in einer Sprüherstarrung ist dessen Schmelzbereich. Dieser muss mindestens oberhalb der Raumtemperatur liegen, sodass feste Partikeln entstehen. Ein hoher Schmelzpunkt erfordert jedoch hohe Produktionstemperaturen, was sich negativ auf die Wirkstoffstabilität auswirken kann. Der Schmelzbereich von Acylglyceriden hängt ab von der Zusammensetzung der Fettsäuren (Sättigungsgrad) und den Positionen, die von den Fettsäuren eingenommen werden [64, S. 174].

2.3.4.2 Struktur von Lipidmikropartikeln

Mono-, Di-, und Triacylglyceride sind polymorphe Substanzen. Sie können beim Erstarren in verschiedenen Modifikationen kristallisieren, die sich in erster Linie in ihrem Schmelzpunkt und in den spektroskopischen Eigenschaften unterscheiden. Es wird meist zwischen α -, β' - und β -Modifikationen unterschieden (siehe Abbildung 10), bei komplexeren Lipid-Zusammensetzungen können aber auch weitere Strukturen vorkommen. [64, S. 174]

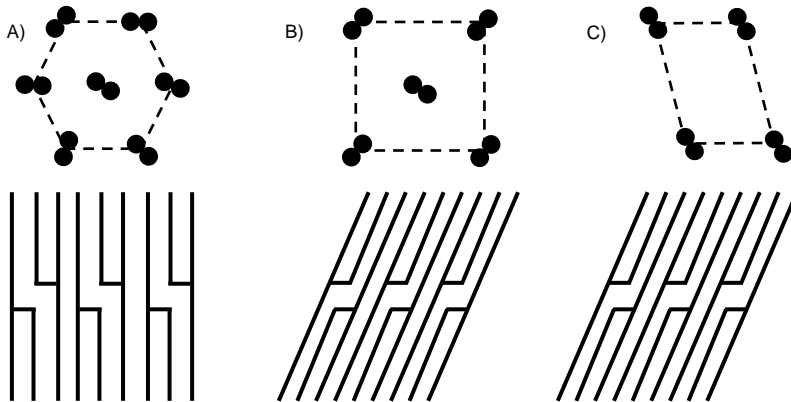


Abbildung 10: Schematische Darstellung der lateralen (oben) und longitudinalen Packungsformen (unten) eines TAG: A) α -Modifikation; B) β' -Modifikation; C) β -Modifikation

Die α -Modifikation ist ein hexagonales System und stellt die thermodynamisch instabilste Form mit dem niedrigsten Schmelzpunkt dar. Beim Erwärmen geht sie über die Übergangsmodifikation β' in die β -Struktur über, wobei der Schmelzpunkt jeweils höher liegt. Bei β' handelt es sich um ein orthorhombisches System, bei dem die Kohlenstoffketten senkrecht aufeinander stehen. In der β -Modifikation sind die Ketten in einem triklinen System parallel angeordnet. [64, S. 174] Die Abkühlrate entscheidet, in welcher Modifikation eine Fettschmelze auskristallisiert. Bei rapidem Abkühlen entsteht zunächst die kinetisch begünstigte α -Form. [72] Während der Lagerung kommt es bereits bei niedrigen Temperaturen zur Umkristallisation über β' zur β -Modifikation [73, S. 687].

2.3.4.3 Freisetzung aus Lipidmikropartikeln

Der Freisetzungsmechanismus in Matrixpartikeln ist vergleichsweise komplex. Bei Pflanzenschutzmitteln sollen die Wirkstoffe bei Kontakt mit Wasser freigegeben werden. Da die Lipidmatrix nicht wasserlöslich ist, müssen die Wirkstoffe durch das Matrixmaterial diffundieren. Das

Diffusionsverhalten wird vom möglichen Schwellen, Auflösen und Zerbrechen der Partikeln bestimmt [74, S.381-387]. Der Mechanismus der Freisetzung bei Matrixkapseln wird anhand von Abbildung 11 veranschaulicht.

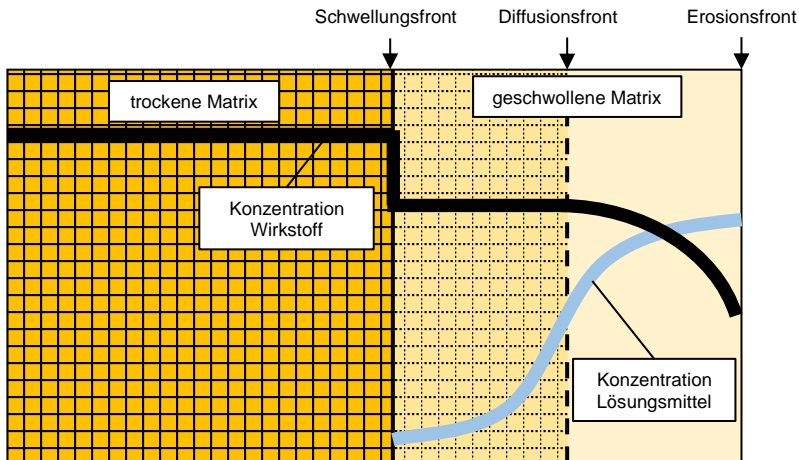


Abbildung 11: Freisetzungsmechanismus aus Lipid-Matrixkapseln mit schematischen Konzentrationsverläufen innerhalb der Grenzschicht

Damit das Herauslösen der Wirkstoffe überhaupt ermöglicht wird, muss das Wasser zunächst in das Matrixmaterial hineindiffundieren. Durch die Einlagerung des Lösungsmittels kommt es zur Schwellung der Kapsel bis hin zu einer Schwellungsfront, die mit der Zeit weiter ins Kapselinnere wandert. Durch das eingelagerte Wasser ist die Wirkstoffkonzentration in diesem Bereich geringer als in der trockenen Matrix. Nur innerhalb der geschwollenen Matrix kann es zum Lösen der Wirkstoffe und schließlich zu deren Diffusion ins umgebende Fluid kommen. Bei schlecht wasserlöslichen Stoffen kann sich eine Diffusionsfront bilden. Sie beschreibt die Grenze, ab der die Wirkstoffe in Lösung vorliegen. In der Abbildung ist die Grenzfläche zwischen Kapsel und Lösungsmittel als Erosionsfront beschrieben, da es zum Ablösen von geschwollenen Teilen der Kapsel kommen kann. Nach der für Matrixkapseln charakteristischen schlagartigen initialen Freisetzung wird das Herauslösen der Wirkstoffe maßgeblich durch die Dicke der Schwellenschicht und durch Erosion bestimmt. Für eine komplette Entleerung der Matrixkapsel ist Erosion wünschenswert, denn die äußeren wirkstoffleeren Schichten würden als Diffusionsbarriere die weitere Freisetzung stark verlangsamen. [74, S. 386 f.]

2.4 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung der Lipidmikropartikeln

Die Partikelgrößenverteilung ist für die Anwendung der Hopfenextrakt-Kapseln im Pflanzenschutz von großer Bedeutung, weil sie im direkten Zusammenhang mit der Freisetzung der Wirkstoffe, Belegung der Blattoberfläche, Suspensionsverhalten, Produktsicherheit etc. steht. Deshalb muss eine Methode entwickelt werden, mit der die Lipidmikropartikeln vermessen werden können. Zwei optische Analyseverfahren wurden im Rahmen der Produktentwicklung getestet: Die Bildauswertung und die Laserbeugung. Da die Partikeln bei der Bildauswertung manuell einzeln vermessen werden müssen, stellt sie eine einfache, aber sehr zeitaufwendige Methode dar. Um die Gesamtheit des Partikelkollektivs möglichst exakt zu repräsentieren, muss die Anzahl der Partikeln ausreichend hoch sein, was lange Zeit in Anspruch nimmt. Im Gegensatz dazu können mittels Laserbeuger in kurzer Zeit sehr viele Partikeln vermessen werden. Das Messprinzip ist relativ komplex und wird im Folgenden beschrieben.

2.4.1 Aufbau und Prinzip des Laserbeugers

Das Messsystem mittels Laserbeuger gehört zu den Streulichtverfahren, deren Messprinzip auf der partikelbedingten Streuung und Absorption von Licht beruht [63, S.178]. Um eine Partikelgrößenverteilung vermessen zu können, müssen Einzelpartikeln vorliegen, d.h. Agglomerate müssen zunächst aufgebrochen werden. Hierzu kann zwischen Trocken- und Nassdispergierung unterschieden werden. Bei der Trockendispergierung wird das Pulver in einen beschleunigten Gasstrom dosiert, der eine Dehnströmung erzeugt. Zusätzlich kann die Zerteilung über Siebe und Prallkaskaden unterstützt werden. Dieses Verfahren eignet sich allerdings nur für fließfähige und wenig kohäsive Partikeln. [63, S. 241] Alternativ dazu erfolgt die Vereinzelung bei der Nassdispergierung in einem flüssigen wasser- oder lösungsmittelbasiertem Medium. Die Methode eignet sich v.a. für kohäsive Partikelsysteme, weil die Haftkräfte innerhalb der Agglomerate in flüssiger Umgebung geringer sind (z.B. aufgrund des Wegfallens von Flüssigkeitsbrücken) [63, S. 78]. Zur Vermessung der Hopfenextrakt-Kapseln wird die Nassdispergierung ausgewählt, da bei der Entwicklung durchaus kohäsive Pulver zu erwarten sind.

Zur Messung werden die Partikeln zunächst in der Nassdispergierereinheit suspendiert. Die Vereinzelung der Kapseln kann ausschließlich durch einen Rührer oder durch zusätzlichen Ultraschall erfolgen. Der Rührer

dient gleichzeitig als Zentrifugalpumpe zum Fördern der Partikelsuspension durch die Probenkammer, ehe die Suspension zurück in den Probebehälter geleitet wird. In der Probenkammer befindet sich ein Fenster, in dem die Messung stattfindet. Durch Beugung, Brechung und Reflexion des Lichtstrahls an einem Partikel entsteht ein Streuungsmuster, das durch eine Detektoranordnung aufgenommen wird. Jeder Partikel in einer polydispersen Probe trägt dabei sein individuelles Streusignal zu einem zusammengesetzten Streuungsmuster bei [75, S.151]. Die Intensität des gestreuten Lichts hängt von Größe und Form der Partikeln, dem Brechungsindex, der Wellenlänge der Lichtquelle, vom Streuwinkel und vom Polarisationswinkel ab [63, S. 178]. Auf Grundlage der Mie-Theorie kann aus der Intensitätsverteilung auf die Partikelgröße zurückgerechnet werden. Die Theorie beschreibt die präzise Lösung der Streuung durch einen kugelförmigen, homogenen, isotropen und nicht magnetischen Partikel von beliebigem Durchmesser in einem nicht absorbierendem Medium [75, S. 66]. Abhängig von der Partikelgröße (x) und Wellenlänge (λ) der Lichtquelle existieren für die Mie-Theorie verschiedene vereinfachte Näherungen. Unterschieden wird zwischen dem Rayleigh-Bereich für $x \ll \lambda$ und dem Fraunhofer-Bereich für $x \gg \lambda$. Oft wird bei Laserbeuger-Messungen die Fraunhofer Näherung verwendet, da bei dieser der Brechungsindex der Partikel vernachlässigt werden kann. Sie kann mit hoher Genauigkeit auf nicht transparente Partikeln mit einem Durchmesser über $30 \mu\text{m}$ angewandt werden. [75, S. 69-76] Gemäß ISO 13320 ist eine Mindestpartikelgröße der 40-fachen Wellenlänge der Lichtquelle erforderlich [76]. Dies muss zunächst für die Hopfenextrakt-Kapseln überprüft werden. Sind sie kleiner als die kritische Partikelgröße, muss zur Größenbestimmung mittels Mie-Theorie der Brechungsindex der Kapseln bestimmt werden.

2.4.2 Darstellung und Kennzeichnung von Partikelgrößenverteilungen

Sowohl die Bildauswertung als auch der Laserbeuger liefert eine Partikelgrößenverteilung als Ergebnis. Diese kann entweder als Summen- oder als Dichteverteilung dargestellt werden. Die Verteilungen sind in stetiger Darstellung mit den charakteristischen Kenngrößen in Abbildung 12 aufgezeigt.

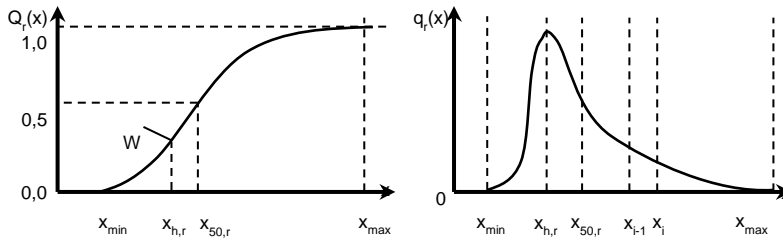


Abbildung 12: Summenverteilung (links) und Dichteverteilung (rechts) mit charakteristischen Kenngrößen

Die Verteilungssumme (Q_r) ergibt sich aus den kumulierten Teilmengen unterhalb einer bestimmten Partikelgröße (x) normiert auf die Gesamtmenge. Im Gegensatz dazu beschreibt die Verteilungsdichte (q_r) die Teilmenge innerhalb einer Kornklasse i (Fraktion) bezogen auf die Intervallbreite (Δx_i). Der Index i beschreibt die Nummer des Partikelgrößenintervalls, r gibt die Mengenart an. Dabei bezeichnet z.B. $r=0$ die Anzahlverteilung und $r=3$ die Volumenverteilung, die bei einheitlicher Partikeldichte auch als Massenverteilung angegeben werden kann. Weiterhin sind in den Diagrammen zwei bedeutende charakteristische Kenngrößen eingezeichnet. Der Medianwert ($x_{50,r}$) ist die Partikelgröße, unterhalb derer 50 % der Partikelmenge liegen. In der Summenkurve ist dies der Wert, bei dem Q_r den Wert 0,5 annimmt. Der Modalwert ($x_{h,r}$) bezeichnet die Partikelgröße, die am häufigsten vorkommt und entspricht dem Maximum in der Dichteverteilung bzw. dem Wendepunkt (W) der Summenverteilung. [63, S. 25-32]

Da die beschriebenen Kennzahlen lediglich Einzelwerte sind, mit denen keine Aussage über den Kurvenverlauf getroffen werden kann, wird in dieser Arbeit eine weitere Größe verwendet, die als „span“ bezeichnet wird und als Maß für die Breite der Verteilung dient. Zur Berechnung des spans müssen die Werte für $x_{10,r}$ und $x_{90,r}$ bestimmt werden. Damit werden die Partikelgrößen bezeichnet, unterhalb derer 10 % bzw. 90 % der Partikelmenge liegen. Der span kann dann nach Gleichung 4 berechnet werden. [77, S. 26]

$$span = \frac{x_{90,r} - x_{10,r}}{x_{50,r}} \quad (4)$$

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

Eine Vielzahl möglicher Materialien zur Kapselherstellung steht zur Verfügung. In diesem Kapitel sind die verwendeten Chemikalien nach ihrer Funktion in der Kapsel aufgegliedert. Außerdem sind alle weiteren verwendeten Substanzen (zum Beispiel zur Analyse) aufgeführt.

3.1.1 Matrixmaterialien

Als Matrixmaterial wurden Lipide getestet, die einen Schmelzbereich unter 90 °C besitzen. Sie sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Liste der als Matrixmaterialien verwendeten Lipide mit den dazugehörigen Schmelzbereichen

Beschreibung	Handelsname / CAS-Nummer	Hersteller	Schmelzbereich
Mono-/ Diglycerid auf Rapsölbasis	Softenol 3995 31566-31-1	Cremer Oleo GmbH	~ 70 °C
Triglycerid auf Rapsölbasis	Softenol 3169	Cremer Oleo GmbH	70 - 75 °C
Gehärtetes Rapsöl	84681-71-0	Hangzhou Dayangchem Co., Limited	68 - 72 °C
Gehärtetes Rizinusöl	8001-78-3	Hangzhou Dayangchem Co., Limited	80 - 85 °C
Gehärtetes Sonnenblumenöl	8001-21-6	Hangzhou Dayangchem Co., Limited	65 - 75 °C
Triglycerid auf Palmölbasis	Waretta 862/ MB 68514-74-9	Walter Rau AG	56 - 60 °C
Carnaubawachs	8015-86-9	Carl Roth GmbH	81 - 86 °C
Bienenwachs	8012-89-3	Carl Roth GmbH	61 - 65 °C
Stearinsäure	57-11-4	Carl Roth GmbH	66 - 69 °C

Palmitinsäure	57-10-3	Carl Roth GmbH	61 - 63 °C
Polyethylenglykol	PEG 2000 25322-68-3	Carl Roth GmbH	48 - 52 °C
Schellack	9000-59-3	Carl Roth GmbH	65 - 80 °C

3.1.2 Hopfenextrakt

Der Wirkstoff wurde von der Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft m.b.H. (HHV) zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen Ethanolextrakt, dessen Zusammensetzung je nach Sorte und Jahr leicht variieren kann. Der Anteil der Humulone, Lupulone und des Xanthohumols in den verwendeten Hopfenextrakten ist in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Anteil der Humulone, Lupulone und des Xanthohumols in den verwendeten Hopfenextrakten.

Herstellungsjahr	Anteil Humulone / %	Anteil Lupulone / %	Anteil Xanthohumol / %
2014	28,0	9,5	1,7
2015	28,0	8,5	2,3
2016	23,1	7,7	2,6

3.1.3 Emulgatoren

Die Emulgatoren, welche für die Stabilisierung der Kapselsuspension und das Herauslösen der Wirkstoffe verwendet wurden, sind in Tabelle 5 aufgelistet.

Tabelle 5: Liste der verwendeten Emulgatoren

Handelsname	Stoffbeschreibung / CAS-Nr.	HLB	Hersteller
Brij S20-PW- (MV)	Polyoxyethylen-(20)-Stearylether	15	Croda International Plc

C-1216	Saccharose-Laurat	16	Mitsubishi-Chemical Foods Corporation
C-1616	Saccharose-Palmitat	16	Mitsubishi-Chemical Foods Corporation
C-1811	Saccharose-Stearat	11	Mitsubishi-Chemical Foods Corporation
C-1815	Saccharose-Stearat	15	Mitsubishi-Chemical Foods Corporation
C-1816	Saccharose-Stearat	16	Mitsubishi-Chemical Foods Corporation
Crodesta F110- PW-(RB)	Saccharose-Stearat	12	Croda International Plc
Crodesta F160- PW-(RB)	Saccharose-Stearat	14,5	Croda International Plc
Crodesta SL40- LQ-(RB)	Saccharose-Laurat	15	Croda International Plc
SE11	Saccharose-Stearat (70 %); Saccharose-Palmitat (30 %)	11	Guangxi Gaotong Food Technology
SE15	Saccharose-Stearat (60 %); Saccharose-Palmitat (40 %)	15	Guangxi Gaotong Food Technology
SE16	Saccharose-Stearat (60 %); Saccharose-Palmitat (40 %)	16	Guangxi Gaotong Food Technology
Span 40-PW- (MV)	Sorbitan-Monopalmitat	7	Croda International Plc
Span 60-PW- (MV)	Sorbitan-Monostearat	5	Croda International Plc
Span 80	Sorbitan-Monooleat	4	Carl Roth GmbH
Tween 21-LQ- (AP)	Polyoxyethylen-(4)-Sorbitan- Monolaurat	13	Croda International Plc
Tween 24- LQ- (AP)	Polyoxyethylen-(16)-Sorbitan- Monolaurat	17	Croda International Plc
Tween 60-LQ- (MV)	Polyoxyethylen-(20)-Sorbitan- Monostearat	15	Croda International Plc

Tween 61-SO-(MV)	Polyoxyethylen-(4)-Sorbitan-Monostearat	10	Croda International Plc
------------------	---	----	-------------------------

Bei den C-Emulgatoren von Mitsubishi-Chemical Foods Corporation, den SE-Emulgatoren der Guangxi Gaotong Food Technology sowie den Crodesta-Emulgatoren von Croda International Plc handelt es sich um Zucker-Fettsäure-Ester. Die HLB-Werte werden dabei durch die Länge und die Anzahl der an den Zucker gebundenen Fettsäuren gesteuert. Dadurch können sich die Produkte je nach Hersteller trotz des identischen HLB-Werts unterscheiden.

3.1.4 Dispergiermittel

Dispergiermittel wurden sowohl intern in die Kapselmatrix integriert als auch extern zur Kapselsuspension hinzugegeben, um die Vereinzelung der Partikeln beim Anrühren zu gewährleisten. Dabei handelt es sich um anionische Tenside. Die untersuchten Substanzen sind mit ihrem Handels- und Stoffnamen (sofern angegeben) in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Dispergiermittel

Handelsname	Stoffbeschreibung / CAS-Nr.	Hersteller
Atlox 4913-LQ-(MV)	Polyacrylat Copolymerlösung	Croda International Plc
Atlox AL-2575-LQ-(MV)	C8-C10 Alkylpolysaccharid	Croda International Plc
Atlox Metasperse 550S-PW-(WD)	Modifiziertes Styren-Polyacrylat	Croda International Plc
Baypure DS 100/40%	Natriumsalz der Polyaspartinsäure 181828-06-8	Kurt Obermeier GmbH
Edaplan 494	Polymeres Dispergiermittel	Münzing Chemie GmbH
Metolat 392	Sulfosuccinat	Münzing Chemie GmbH

3.1.5 Antioxidantien, UV-Schutzmittel

Zum Schutz der empfindlichen Wirkstoffe wurden verschiedene Antioxidantien und UV-Schutzmittel in die Kapseln integriert. Die untersuchten Substanzen sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Eingesetzte Antioxidantien und UV-Schutzmittel

Stoffbezeichnung	Handelsname / CAS-Nr.	Hersteller
L(+)-Ascorbinsäure	50-81-7	Carl Roth GmbH
Butylhydroxyanisol (BHA)	25013-16-5	Sigma-Aldrich, Inc.
Butylhydroxytoluol (BHT)	128-37-0	Carl Roth GmbH
Carotin (aus <i>Tagetes erecta</i>)	7235-40-7	Carl Roth GmbH
Tert-Butylhydrochinon (TBHQ)	1948-33-0	Sigma-Aldrich, Inc.
DL- α -Tocopherol	10191-41-0	Carl Roth GmbH
Ethylhexyl Methoxycinnamat	Uvinul MC 80	BASF SE
Bis-ethylhexyloxyphenol methoxyphenyl Triazin	Tinosorb S	BASF SE

Bei Ascorbinsäure, Carotin und Tocopherol handelt es sich um Antioxidantien natürlichen Ursprungs, BHA, BHT und TBHQ sind synthetische Substanzen. Tinosorb S dient als Breitband-UV-Filter und absorbiert Licht zwischen den Wellenlängen 280 nm und 380 nm. Die Absorptionsmaxima liegen bei 310 nm und 343 nm. Bei Uvinul MC 80 handelt es sich um einen UVB-Filter mit einer Absorption im Wellenlängenbereich von 280 nm bis 360 nm und einem Maximum bei 310 nm.

3.1.6 Haftmittel

Um die Regenresistenz der Kapseln nach der Ausbringung im Feld zu verbessern, wurden verschiedene Haftmittel der Firma Clariant untersucht (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 8: Untersuchte Haftmittel

Stoffbezeichnung	Hersteller
Licowax PED Emulsion	Clariant AG
Licowax PED Anionic Emulsion	Clariant AG
Licocare RBW Anionic Emulsion	Clariant AG
Agrocer ADD 410 TP	Clariant AG

Zur besseren Übersicht wird im weiteren Verlauf der Arbeit nur das erste Wort der jeweiligen Bezeichnung verwendet. Licowax PED Emulsion wird als Licowax 1, Licowax PED Anionic Emulsion als Licowax 2 abgekürzt.

3.1.7 Sonstige Chemikalien

Neben den Materialien zur Kapselherstellung wurden weitere Substanzen zur Analyse mittels Kapillarelektrophorese oder Laserbeuger, Färbung der Kapseln etc. verwendet. Sie sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Sonstige Chemikalien

Stoffbezeichnung	Handelsname / CAS-Nr.	Hersteller
Methanol (MeOH)	67-56-1	Carl Roth GmbH
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat	13472-35-0	Carl Roth GmbH
Natriumhydroxid (NaOH)	1310-73-2	Carl Roth GmbH
Salzsäure (HCl)	7647-01-0	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulfat (SDS)	151-21-3	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	77-86-1	Carl Roth GmbH
Probenstandard der Hopfen-Bittersäuren	<i>International Calibration Extract (ICE-3)</i>	Labor Veritas AG

Probenstandard Xanthohumol	Xantho-Flav Pur	Hallertauer Hopfen- veredelungsgesellschaft m.b.H.
Rhodamin B	81-88-9	Carl Roth GmbH
Natriumdisulfit	7681-57-4	Carl Roth GmbH
Periodsäure	10450-60-9	Carl Roth GmbH
Fuchsin-schweflige Säure	Schiffs Reagenz	Carl Roth GmbH
2,3-Isopropylidenglycerin	Glycasol 100-79-8	Glaconchemie GmbH

3.2 Methoden

In diesem Kapitel werden die Herstellung der Pulver durch das Verfahren der Sprüherstarrung und die verwendeten Analysemethoden beschrieben.

3.2.1 Herstellung von Pulvern

Für die Entwicklung der optimalen Kapselzusammensetzung musste eine Vielzahl an Varianten hergestellt werden. Um die benötigten Ausgangsstoffe möglichst gering zu halten, wurden die Hopfenextrakt-Kapseln mithilfe einer Sprüherstarrungsanlage für Pulvermengen zwischen 100 g und 600 g produziert. Das Fließbild der Anlage ist in Abbildung 13 dargestellt.

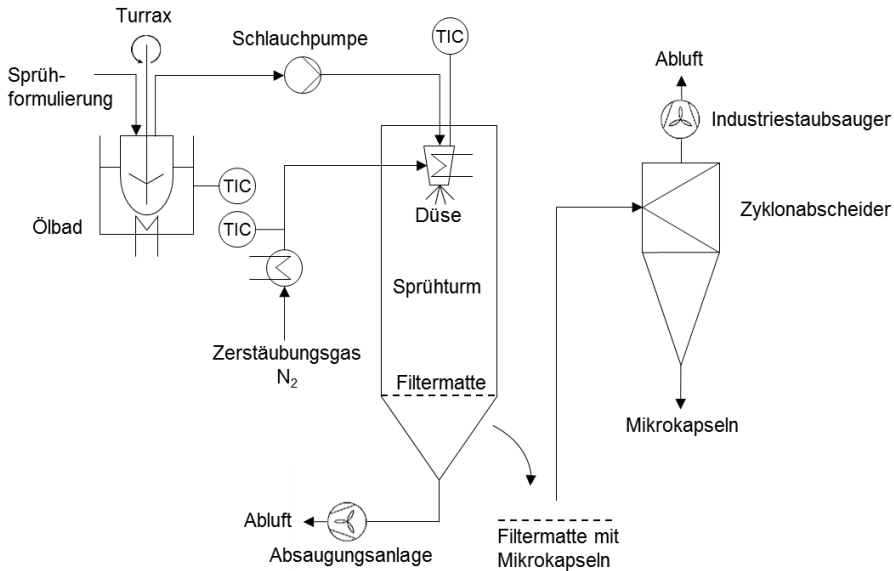


Abbildung 13: Fließbild der verwendeten Anlage zur Produktion von Hopfenextrakt-Mikrokapseln mit dem Verfahren der Sprüherstarrung. Temperaturmessstellen sind mit TIC abgekürzt

Die Sprühformulierung wurde in einem durch ein Ölbad temperiertes Becherglas angerührt. Zunächst wurde das Matrixmaterial im geschmolzenen Zustand vorgelegt. Die weiteren Bestandteile wurden anschließend mithilfe eines Ultra-Turrax T18 digital der Firma IKA-Werke GmbH & Co. KG in die Schmelze eingerührt und auf Sprühtemperatur erwärmt. Die Formulierung wurde durch eine unbeheizte Schlauchpumpe zur Düse gefördert. Um ein Erstarren im Schlauch zu verhindern, lag die eingestellte Temperatur des Ölbad ca. 5 – 10 °C über dem Schmelzpunkt des verwendeten Matrixmaterials. Die Zerstäubung erfolgte in einer beheizten außenmischenden Zweistoffdüse mit einem Bohrungsdurchmesser von 0,5 mm. Als Zerstäubungsgas diente Stickstoff, welcher durch ein Ölbad auf 100 °C erhitzt wurde. Die Schmelze wurde bei einem Gasdruck von 5 bar im Sprühturm zerstäubt, wo die entstandenen Tropfen auf Raumtemperatur abkühlten und dabei zu Partikeln erstarrten. Durch eine Absauganlage wurde am Boden des ca. 6 m langen Turms ein Luftstrom erzeugt, aus dem die abgekühlten Hopfenextrakt-Kapseln mithilfe einer Filtermatte (Typ ET 3, EV 3, 15 mm der Firma Telle GmbH) abgetrennt wurden. Im Anschluss wurde der Filterkuchen mit einem Industriestaubsauger (Modell Professional NT 57/1 der Firma Kärcher) abgesaugt, wobei die Mikrokapseln über einen dazwischen geschalteten

Zyklon von der Luft abgetrennt und in einem Probenbehälter aufgefangen wurden.

3.2.2 Suspensionsstabilität

Die Kapseln müssen sich einfach in Wasser einrühren lassen und im Spritztank der Feldspritze in Schwebe bleiben. Als Maß für diese Eigenschaft dient die Suspensionsstabilität (*suspensibility*), deren Bestimmung in einem vom *Collaborative International Pesticides Analytical Council* (CIPAC) veröffentlichtem Handbuch, in dem Standard-Analyseverfahren für Pflanzenschutzmittel vorgeschlagen werden, beschrieben ist. Sie wurde nach der Methode MT 15: „*Suspensibility of wettable powders in water*“ [78, S. 45-52] bestimmt, die zur Messung der Hopfenextrakt-Kapseln leicht abgeändert wurde. Es wurden 0,83 g der Mikrokapseln in einen 100 ml Erlenmeyerkolben gegeben und mit raumtemperiertem Leitungswasser auf 50 g aufgefüllt. Die Suspension wurde eine Minute lang auf einem Magnetrührer bei 800 U/min gerührt und anschließend in einen 250 ml Messzylinder überführt. Dieser wurde bis zur 250 ml-Marke mit raumtemperiertem Leitungswasser aufgefüllt. Die Wassertemperatur ist entscheidend, da sich bei einem Temperaturgradienten zwischen Wasser und Umgebung Konvektionsströme bilden, die das Ergebnis verfälschen würden. Der Messzylinder wurde 30-mal invertiert und 30 min lang ruhen gelassen. Im Anschluss wurden die oberen 225 ml der Flüssigkeit mit einer Schlauchpumpe abgesaugt. Die unteren 10 % der Suspension wurden mit einem Rundfilter mit 2 - 3 µm Porengröße abfiltriert und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, um am Folgetag die Trockenmasse des Filterkuchens zu bestimmen. Abschließend erfolgte die Berechnung der Suspensionsstabilität nach Gleichung 5. Dabei steht S für die Suspensionsstabilität, m für die Masse der eingewogenen Hopfenextrakt-Kapseln und Q für die Trockenmasse des Filterkuchens.

$$S = \frac{10}{9} \cdot \frac{100 (m - Q)}{m} \quad (5)$$

3.2.3 Messung der freigesetzten Wirkstoffmenge

Die Hopfenextrakt-Kapseln sollen bei Kontakt mit Wasser die verkapselten Wirkstoffe freigeben. Um die freigesetzte Wirkstoffmenge zu bestimmen, musste ein Messverfahren entwickelt werden, welches es ermöglicht, die Konzentrationen der einzelnen Wirkstoffe in Wasser zu messen. Im

Folgendes wird das Vorgehen bei der Probenpräparation und die Analyse mittels Kapillarelektrophorese erklärt.

3.2.3.1 Probenvorbereitung

Zur Freisetzung der Wirkstoffe wurden die Kapseln in Wasser suspendiert. Es wurden 2 g des Pulvers in 75 ml raumtemperiertem Leitungswasser zehn Minuten lang auf einem Magnetrührer bei 800 U/min gerührt. Anschließend wurde die Suspension mithilfe eines Cellulose-Rundfilters mit einem Rückhaltebereich von 2 – 3 μm abfiltriert. Da die Zeit zum kompletten Abtrennen der Partikel von der Flüssigkeit je nach Kapselvariante stark variierte, wurde nach zehn Minuten das Permeat entnommen und durch einen Cellulose-Spritzenfilter mit einem Porendurchmesser von 0,45 μm filtriert, um ein Verstopfen der Kapillare des Analysegeräts zu verhindern. Für die Messung wurden die Proben im Verhältnis 1:2 mit dem Laufpuffer verdünnt.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung mittels Kapillarelektrophorese

Die Vermessung der wässrigen Wirkstoff-Lösungen wurde mit einem Kapillarelektrophorese-System, einer ^{3D}*high performance capillary electrophoresis* (HPCE) der Firma Hewlett-Packard, durchgeführt. Die Auftrennung durch Elektrophorese basiert auf der Migration geladener Teilchen in einer Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes [79, S. 735]. Bei einer HPCE geschieht die Auftrennung innerhalb einer Kapillare, was den Vorteil hat, dass thermisch induzierte Konvektionsströme vermindert werden können [80]. Der schematische Aufbau des Messinstruments ist in Abbildung 14 dargestellt.

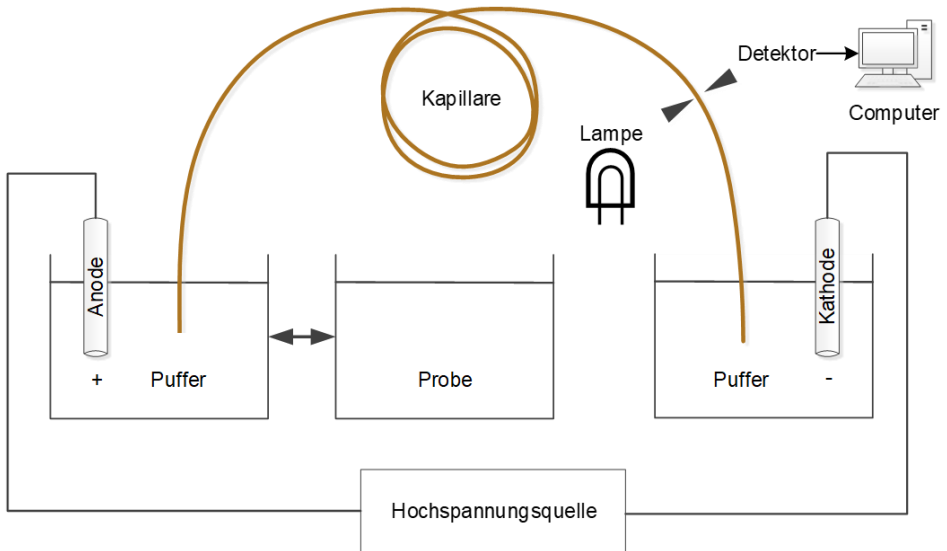


Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer HPCE

Zur Analyse der Hopfen-Wirkstoffe wurde eine Siliziumdioxid-Kapillare mit einem Innendurchmesser von $50\ \mu\text{m}$ und einer effektiven Länge von $56\ \text{cm}$ ausgewählt. Zu Beginn der Messung wurde die Probe vier Sekunden lang unter $50\ \text{mbar}$ Druck in die mit Puffer gefüllte Kapillare injiziert. Anschließend wurden die beiden Enden der Kapillare in mit Puffer gefüllte Vials getaucht. Die Auftrennung innerhalb der Kapillare wird durch das Anlegen einer Spannung von $25\ \text{kV}$ gestartet. Grundsätzlich treten beim Anlegen eines elektrischen Feldes zwei Effekte in der Kapillare auf: Die elektrophoretische Wanderung der Ionen und der elektroosmotische Fluss (EOF), welcher den gesamten Puffer durch die Kapillare in Richtung Kathode fließen lässt [81, S. 11]. Da es sich bei den Wirkstoffen des Hopfens um ungeladene Moleküle handelt, würden sich diese mit der Geschwindigkeit des EOFs durch die Kapillare bewegen. Damit eine Auftrennung der einzelnen Wirkstoffe möglich ist, musste eine Spezialform der Elektrophorese verwendet werden, die sogenannte mizellare elektrokinetische Chromatographie (MEKC). Hierfür wurde das anionische Detergens SDS oberhalb der kritischen mizellaren Konzentration in den Puffer gemischt, um geladene Mizellen zu erzeugen. Die Auftrennung der ungeladenen Substanzen erfolgt bei einer MEKC durch ihre Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der wässrigen mobilen Phase und in den Mizellen, einer pseudo-stationären Phase [82]. Da die negativ geladenen Mizellen langsamer als die mobile Phase wandern, haben Moleküle, die stark mit den Mizellen wechselwirken eine längere

Wanderungszeit. Damit ist die MEKC eine Kombination aus einem elektrophoretischen und einem chromatographischen Trennmechanismus [83]. Am Ende der Kapillare befindet sich das Messfenster, in welchem die Absorption der Probe gemessen wird. Für die Messung wurde eine Deuteriumlampe als Lichtquelle und ein Diodenarray-Detektor (DAD) verwendet, mit dem ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 190 – 590 nm aufgenommen werden konnte. Zur quantitativen Analyse wurde die Absorbanz bei 321 nm verwendet.

Die Auftrennung der Hopfenwirkstoffe wurde mit einem 10 mM Phosphat, 25 mM TRIS und 10 % (v/v) Methanol Puffer durchgeführt, welchem 25 mM SDS als Detergens hinzugefügt wurden. Der pH-Wert wurde auf 9 eingestellt. Die einzelnen Wirkstoffe eluieren nach unterschiedlicher Laufzeit. Das Ergebnis wird als Elektropherogramm dargestellt, dessen Peaks den einzelnen Substanzen zugeteilt werden können (Abbildung 15).

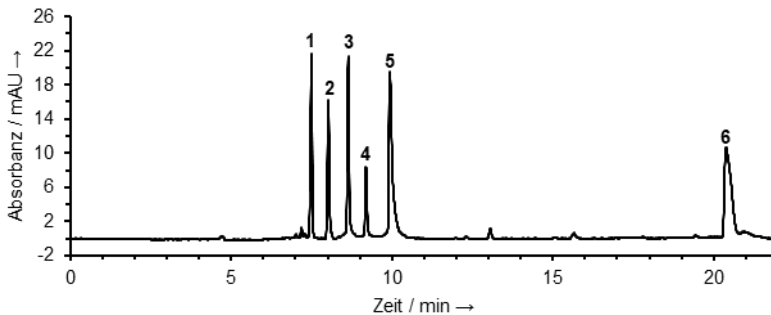


Abbildung 15: Elektropherogramm der Hopfeninhaltsstoffe bei einer Wellenlänge von 321 nm. Peaks: 1 = Colupulon, 2 = Ad-/Lupulon, 3 = Cohumulon, 4 = Adhumulon, 5 = Humulon, 6 = Xanthohumol

Die Flächen der Peaks aus dem Elektropherogramm wurden durch erstellte Kalibrierungen in Konzentrationen umgerechnet. Zur Vereinfachung wurden die drei Formen der Humulone bzw. der Lupulone zusammengefasst, weshalb im Folgenden nur zwischen Humulonen, Lupulonen und Xanthohumol unterschieden wird.

Zum Reinigen und Konditionieren der Kapillare wurden Programme für das *preconditioning* vor jeder Messung, das *postconditioning* nach jeder Messung und das Reinigen zum Beginn jedes Messtages festgelegt. Dabei wurde die Kapillare mit verschiedenen Chemikalien gespült. Der Ablauf der Programme ist in Tabelle 13 im Anhang zusammengefasst.

3.2.4 Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeuger

Die Messungen der Partikelgrößenverteilung erfolgten anhand eines Laserbeugers mit der Modellbezeichnung Mastersizer 2000 des Herstellers Malvern Instruments. Zur Messung stehen dem Gerät zwei Lichtquellen zur Verfügung: ein Helium-Neon-Laser, welcher rotes Licht der Wellenlänge 633 nm emittiert, und eine LED, welche blaues Licht der Wellenlänge 466 nm erzeugt. Dadurch können laut Herstellerangaben Proben in einem Größenbereich von 0,02 - 2000 µm vermessen werden. Zur Probendispersierung wurde eine Nassdispersiereinheit mit der Bezeichnung Hydro 2000S verwendet. Die Nasszelle fasst ein Volumen von 150 ml Dispersiermedium. Die Messungen erfolgten in Wasser, um der späteren Anwendung möglichst realitätsnah zu entsprechen.

3.2.4.1 Bestimmung des Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln

Zur Auswertung der im Laserbeuger entstehenden Streuungsmuster muss im Falle von Partikeln mit Durchmessern unter 18,6 µm zunächst der Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln bestimmt werden, da dann gemäß ISO 13320 die Fraunhofer-Näherung nicht verwendet werden kann (vgl. Kap. 2.4.1.1). Der Brechungsindex setzt sich aus einem Realteil (n), welcher die Brechung beschreibt, und einem Imaginärteil (k), der die Absorption beinhaltet, zusammen. Die Berechnung des komplexen Brechungsindex (b) erfolgt nach Gleichung 6, wobei i für die imaginäre Einheit steht. [75, S. 159]

$$b = n - i \cdot k \quad (6)$$

Da in der Literatur keine vergleichbaren Werte für den Brechungsindex der Mikrokapseln vorhanden sind, muss dieser experimentell bestimmt werden. Dafür sind verschiedene Methoden bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Vorgehen getestet.

Nach Saveyn et al. [84] werden Suspensionen der Partikel in verschiedenen Konzentrationen bis zu einem Massenanteil von 1 % in einem geeignetem Lösungsmittel angesetzt – im Falle der Hopfenextrakt-Kapseln wurde VE-Wasser mit 1 %(w/w) SDS verwendet. Im Anschluss wird mit einem Abbe-Refraktometer der Brechungsindex bestimmt und gegen die Konzentration aufgetragen. Mithilfe einer linearen Trendlinie wird auf eine Konzentration von 100 % extrapoliert, bei welcher der Brechungsindex dem der Partikel entsprechen soll.

Die zweite Bestimmungsmethode beruht auf einer iterativen Näherung, bei welcher sowohl Realteil als auch Imaginärteil des Brechungsindex variiert werden, bis das genaueste Ergebnis entsteht. Dazu müssen Real- und Imaginärteil abgeschätzt werden, um durch Gleichung 6 den Brechungsindex zu bestimmen. Eine Methode zur Abschätzung des Realteils des Brechungsindex wird von Hayakawa et al. [85] vorgeschlagen. Hierbei werden verschiedene Werte für den Realteil gewählt und die Partikelgrößenverteilung berechnet. Die Auswahl des Testbereichs für den Imaginärteil basiert auf einer Empfehlung von Malvern, wonach für leicht farbige Pulver ein Wert zwischen 0,1 und 1 vorgeschlagen wird [86]. Das Kriterium für den „optimalen“ Brechungsindex ist dabei der höchste resultierende $x_{50,3}$ - und $x_{10,3}$ -Wert, da sich ein falsch gewählter Brechungsindex vor allem bei kleinen Partikelgrößen bemerkbar macht [85].

3.2.4.2 Messung der Partikelgrößenverteilungen mittels Dispersionstitration

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde der Laserbeuger für mehrere Zwecke verwendet: die Bewertung der Dispergierbarkeit der Kapselvarianten und die Bestimmung der Größenverteilung der Einzelpartikel. Deshalb steht bei letzterer die Vereinzelung der Partikeln im Vordergrund. Hierbei muss zwischen emulgatorhaltigen Kapseln und Partikeln ohne internen Emulgator unterschieden werden. Da die Lipidpartikeln ohne Tensid nicht im Wasser vereinzelt werden können, wurde der Nasszelle 7,5 g SDS hinzugefügt. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Probe, bis eine Verdunkelung zwischen 5 % und 12 % erreicht war. Die Messung verlief mit der Methodik der Dispersionstitration. Dabei wird der Verlauf der $x_{10,3}$ -, $x_{50,3}$ - und $x_{90,3}$ -Werte über die Anzahl der Messungen bzw. der Zeit aufgetragen. Die Messdauer wurde auf 20 Sekunden festgelegt. Die Methode unterteilt sich in drei Phasen, die je nach Versuch eine unterschiedliche Anzahl an Messzyklen beinhalten:

1. Messungen bei reinem Röhreintrag (2500 rpm)
2. Messungen mit zusätzlichem Ultraschall (10 %)
3. Messungen ohne Ultraschall

In Phase 1 wird untersucht, wie gut die Probe durch reinen Röhreintrag vereinzelt werden kann. Anschließend sollen übrige Agglomerate in Phase 2 durch Ultraschall zerkleinert werden. Entscheidend ist, dass die Partikelgrößen einen konstanten Wert annehmen, da eine stetige

Reduktion auf eine Probenzerkleinerung hinweist. Die Messungen mit Ultraschall sollen Auskunft über die tatsächliche Größenverteilung der Einzelpartikeln liefern. Phase 3 dient zur Beurteilung der Stabilität der Dispersion gegen Reagglomeration. Steigen die Partikelgrößen innerhalb der Phase wieder an, ist die Dispersion instabil und erfordert weitere Zugabe von Tensiden. Alle relevanten Messparameter sind in Tabelle 13 im Anhang zusammengefasst.

Ein Nachteil der Messung mittels Laserbeuger ist, dass das Ergebnis sehr schwer nachvollziehbar ist. So kann zum Beispiel am Messergebnis nicht erkannt werden, ob lediglich eine Zerkleinerung von Agglomeraten oder ein Zerfall der Partikeln stattfindet. Deshalb wurden auffällige Ergebnisse aus der Laserbeugermessung anhand optischer Betrachtung durch ein Lichtmikroskop überprüft.

3.2.5 Überprüfung der Wirkstoffstabilität

Die Stabilität der Wirkstoffe muss während der Produktion, Lagerung und nach Ausbringung auf dem Feld gewährleistet sein. Dazu wurde der Wirkstoff aus Mikrokapseln sowohl nach der Produktion bei verschiedenen Parametern als auch nach der Lagerung extrahiert und mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Der Aufschluss und die Analyse wurden von der HHV durchgeführt. Dadurch kam es zu mehreren Tagen Verzögerung zwischen Verarbeitung und Analyse der Proben. Um den Abbau währenddessen so gering wie möglich zu halten, wurden die Proben zum Transport licht- und luftdicht in Braunglas-Fläschchen abgefüllt. Die Methoden zur Untersuchung verschiedener Parameter des Wirkstoffabbaus sind im Folgenden beschrieben.

3.2.5.1 Abbau während der Produktion

Während der Herstellung sind die Wirkstoffe erhöhten Temperaturen ausgesetzt. Zudem kann es durch das Dispergierwerkzeug zu zusätzlichen Energie- und Lufteintrag in die Schmelze kommen. Um den Abbau der Wirkstoffe während der Produktion auszuwerten, wurden in einem 400 ml Becherglas 140 g verschiedener Rezepturen 13 min bzw. 60 min lange bei 80 °C und einer Rührerdrehzahl von 10.000 rpm angemischt. Im Anschluss wurden mit der Schmelze gemäß der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode Mikrokapseln produziert.

3.2.5.2 Vergleich des Abbaus im Vakuum und unter UV-Einstrahlung

Um die korrekten Maßnahmen zur Erhöhung der Wirkstoffstabilität treffen zu können, muss der Abbau der verkapselten Wirkstoffe unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurde ein von M. Pemsel entwickelter Versuchsaufbau verwendet, der zur Nachbildung der natürlichen Sonneneinstrahlung im Labor errichtet wurde [65, S. 150-157]. Bei diesem sind vier UV-Röhren vom Typ Exo-Terra Repti Glo 10.0 der Firma Hagen auf einem Gerüst angebracht. Die Lampen wurden ausgewählt, da sie Licht mit einer Wellenlänge von 300 nm bis 380 nm emittieren. Die Hopfenextrakt-Kapseln wurden auf Backpapier-Ausschnitte ausgebreitet, um sowohl Licht- als auch Sauerstoffkontakt zu ermöglichen. Zur Untersuchung der Lichteinwirkung wurden Vergleichsproben mit Alufolie abgedeckt. Anschließend wurden die Proben in zwei Exsikkatoren gelegt (Abbildung 16). Nur einer der beiden Behälter wurde im Anschluss evakuiert, damit der Einfluss des Kontakts mit Sauerstoff aus der Luft beobachtet werden konnte. Die Exsikkatoren wurden für 24 Stunden unter die UV-Röhren platziert. Danach wurde der Wirkstoffgehalt in den Pulvern bestimmt.



Abbildung 16: Hopfenextrakt-Kapseln in Exsikkatoren zur Untersuchung des Einflusses von Licht und Luft auf die Wirkstoffstabilität

3.2.5.3 Stabilität bei Raumtemperatur im geöffneten Behälter

Um die Auswirkung verschiedener Antioxidantien abschätzen zu können, wurden je 1,5 g frisch produzierte Hopfenextrakt-Kapseln in Petrischalen mit Belüftungsnocken und einem Durchmesser von 35 mm abgefüllt. Die Behälter sind nicht luftdicht, weshalb ein Gasaustausch mit der

Umgebungsluft möglich ist. Die Proben wurden in einem Inkubator bei 20 °C sechs Tage lang gelagert, ehe sie zur Analyse geschickt wurden.

3.2.5.4 Stabilität bei erhöhter Temperatur

Die Untersuchung der Stabilität bei erhöhter Lagerungstemperatur wird von der WHO vorgeschlagen, um u.a. eine frühe Vorhersage über die Langzeitstabilität der Formulierung treffen zu können [46, S. 62]. Die Pulver wurden dazu direkt im Anschluss an die Produktion in Braunglasfläschchen abgefüllt, um die bestmöglichen Lagerbedingungen zu erreichen. Die Lagerung erfolgte in einem Inkubator bei 54 °C über eine Dauer von 14 Tagen.

3.2.6 Dynamische Differenzkalorimetrie

Zur Analyse der Kristallstruktur einiger Reinstoffe und der produzierten Lipidmikropartikeln wurde die Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC) verwendet. Bei dem Messgerät handelt es sich um das Modell DSC822^e der Firma Mettler Toledo.

Die Proben wurden zur Messung in Aluminium-Tiegel gefüllt und versiegelt. Zur Analyse von Schmelz- und Kristallisationsvorgängen eignet sich eine Probemasse von 5 – 10 mg. Die Messung setzt sich aus einer Aufheizphase, einer Abkühlphase und einer zweiten Aufheizphase zusammen. Damit alle Schmelz- und Kristallisationsvorgänge aufgezeichnet werden können, wird die Starttemperatur 50 K unter dem ersten zu erwartenden Effekt und die Endtemperatur 50 K über dem letzten zu erwartenden Effekt festgelegt. Deshalb wurde vor jeder Messung zunächst auf -10 °C abgekühlt und 5 min lang gewartet, ehe die erste Aufheizphase mit einer Heizrate von 5 K·min⁻¹ bis zu einer Temperatur von 120 °C durchgeführt wurde. Die anschließende Abkühlung erfolgte mit einer Rate von -10 K·min⁻¹, bis zur Starttemperatur von -10 °C. Nach erneutem fünfminütigen Warten wurde Aufheizphase zwei analog zum ersten Aufheizen durchgeführt. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mithilfe der Software STAR^e (Version 15.01).

3.2.7 Bestimmung der Wasseraktivität

Die Wasseraktivität beschreibt den Anteil an freiem ungebundenen Wasser einer Probe. Sie wird als a_w -Wert bezeichnet, der sich aus dem Verhältnis des Wasserdampfpartialdrucks p in der Probe zum Sättigungsdampfdruck p_0 reinen Wassers zusammensetzt (siehe Gleichung 7). [87, S. 479]

$$a_w = \frac{p}{p_0} \quad (7)$$

Es muss beachtet werden, dass der a_w -Wert nicht den Gesamtgehalt von Wasser in einer Probe beschreibt, da dieser sich aus den Anteilen an freiem und gebundenem Wasser zusammensetzt. Mit dieser Methode lässt sich keine Aussage über den Absolutwert der Feuchte in der Probe treffen, weshalb der a_w -Wert nur verwendet wurde, um zeitliche Veränderungen in den Hopfenextrakt-Kapseln während der Lagerung festzuhalten. Trocknet eine Probe aus, so sinkt auch der a_w -Wert.

Die Analyse erfolgte mittels LabMaster- a_w der Firma Novasina. Die dazugehörigen Probenschalen werden zu etwa zwei Dritteln mit Pulver befüllt. Zur Messung wurden die Schalen in der Messkammer auf 25 °C temperiert. Sobald die Analyse gestartet wird, wird mit der Aufzeichnung des a_w -Werts begonnen. Die Messung läuft solange, bis sich ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenen Wassergehalt in der Messzelle einstellt – d.h. ein stabiler a_w -Wert gemessen wird. Der Messwert gilt dann als stabil, wenn sich die Wasseraktivität innerhalb von 20 min nicht um mehr als $\pm 0,001 a_w$ verändert und die Temperatur innerhalb von 5 min um nicht mehr als $\pm 0,1$ K schwankt.

3.2.8 Auftragen der Kapseln auf Trägerplatten und Test der Regenfestigkeit

Es soll untersucht werden, wie sich die Kapseln in der Anwendung beim Besprühen der Pflanzen verhalten. Für einen effizienten und lang anhaltenden Schutz ist es wichtig, dass möglichst viele Hopfenextrakt-Kapseln in einer homogenen Schicht auf die Blätter aufgetragen werden und dass sich Haftkräfte ausbilden, die das Abwaschen durch Regen verhindern. Um diese Eigenschaften im Labor zu testen, wurden quadratische Plexiglasplatten mit einer Seitenlänge von 8 cm mit schwarzem wasserabweisenden Glanzlack beschichtet. Die dadurch geschaffene hydrophobe Oberfläche ermöglicht eine Vorhersage zur Benetzung und Regenfestigkeit auf den Blättern. Zur Unterscheidung der Kapseln vom Hintergrund während der optischen Auswertung wurde die Farbe Schwarz ausgewählt.

Das Aufbringen der Kapseln erfolgte möglichst realitätsnahe. Hierfür wurde 500 ml einer Kapsel-Suspension mit Leitungswasser und einer Kapselkonzentration von $8,33 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ angesetzt. Zur Beschichtung der Platten

wurde ein Aufbau mit einem Förderband und einer praxisüblichen Düse einer Feldspritze durchgeführt. Die Kapselsuspension wurde in einen Druckbehälter gefüllt, der über einen Schlauch mit der Düse verbunden war. Zum Besprühen der Platten wurde der Behälter mit einem Luftdruck von 3 bar beaufschlagt, bei dem sich ein Durchfluss von $0,2 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$ durch die verwendete Hohlkegeldüse vom Typ Albuz ATR der Firma Agrotop einstellte. Die Platten wurden im Anschluss auf das Förderband platziert und mit einer Geschwindigkeit von $0,27 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ durch den Sprühkegel transportiert. Der Winkel, mit dem die Platten ausgerichtet waren, wurde mit Hilfe einer Halterung variiert. Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 17 dargestellt.



Abbildung 17: A) Applikationsapparat für die Beschichtung von Platten mit Kapselsuspension
 B) Platte auf einer Halterung zur Variation des Winkels unter der verwendeten Hohlkegeldüse

Nach dem Auftragen der Kapselsuspension wurden die Proben bei Raumtemperatur getrocknet und die Anzahl der anhaftenden Partikeln optisch ausgewertet. Die Methode zur optischen Analyse des Sprühbelags ist in Kapitel 3.2.9.4 beschrieben.

Um die Regenresistenz zu bestimmen, wurde dieselbe Applikationsapparat verwendet. Hierfür wurden die mit Kapseln beladenen Platten in einem Winkel von 15° auf dem Förderband platziert. Zur Simulation des Regens wurde der Druckbehälter mit VE-Wasser befüllt, das mit einem Druck von 3 bar durch eine Flachstrahldüse vom Typ AT AVI-80-01 des Herstellers Agrotop auf die Platten gesprüht wurde. Diese Einstellungen entsprechen einem Volumenstrom von $0,4 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$. Jede Platte wurde zwei Mal auf diese Weise beregnet, wobei nach dem ersten Durchgang eine Wartezeit von 20 s zum Aufweichen der Kapseln eingeschoben wurde. Zuletzt wurde nach dem Trocknen der Platten erneut die Anzahl der verbleibenden Kapseln bestimmt.

3.2.9 Optische Charakterisierung

Zur optischen Charakterisierung der Mikrokapseln wurden verschiedene Methoden der Mikroskopie verwendet. In diesem Kapitel sind die verwendeten Mikroskope und die Probenvorbereitung für die speziellen Untersuchungen zusammengefasst.

3.2.9.1 Untersuchung von Kapselsuspensionen mittels Durchlichtmikroskopie

Die optische Untersuchung von Partikeln in Suspension erfolgte mit einem Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskop vom Typ DMI 6000 B der Firma Leica. Ziel der Bildaufnahmen war es, die Beobachtungen zur Dispergierbarkeit aus dem Mastersizer zu überprüfen und eventuell unerkannte Phänomene aufzudecken. Dafür wurden 0,5 g Kapselpulver in einem Erlenmeyerkolben auf 50 g mit Leitungswasser aufgefüllt und anschließend 30 min lang mit einem Magnetrührer mit $800 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ gerührt. Um die Zerkleinerung von Agglomeraten nachvollziehen zu können, wurden alle 5 min etwa $5 \mu\text{l}$ der Suspension entnommen und auf einen Objektträger aufgetragen. Anschließend wurde dem Tropfen ein Deckgläschen aufgelegt, das zur Vergrößerung des Abstandes an den Ecken mit Knete versehen wurde, um ein Zerdrücken der Kapseln zu vermeiden.

3.2.9.2 Charakterisierung der Partikeloberfläche und Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Rasterelektronenmikroskopie

Um eine möglichst detaillierte Abbildung der Partikeloberfläche zu erhalten, wurden Aufnahmen mit einem Rasterelektronenmikroskop (REM) erstellt. Die Voraussetzung zur Betrachtung im REM ist die Leitfähigkeit der Probenoberfläche. Da Lipidpartikel dies nicht erfüllen, wurden sie mit einer Goldschicht überzogen. Dies erfolgte durch die sogenannte Sputterbeschichtung, bei der aus einer Goldkathode mittels Argonplasma einzelne Atome abgespalten und auf die Pulverprobe aufgetragen werden. Hierzu wurde das Pulver zunächst auf einem Probenhalter mit leitfähigem Kohlenstoff-Klebeband fixiert. Die Beschichtung mit Gold erfolgte im Anschluss mit dem Sputtergerät Hummer der Firma Technics. Dazu wurde in der mit Argon gefüllten Kammer ein Vakuum von 100 mTorr (ca. 0,13 mbar) erzeugt und daraufhin eine Spannung von 7 – 9 kV angelegt, sodass eine Stromstärke von 5 – 6 mA erreicht wurde. Um Hitzeentwicklung und damit ein Schmelzen der Lipidpartikeln zu vermeiden, wurde die Spannung in 30 Intervallen zu je 5 s appliziert. Dazwischen wurde jeweils 15 s lange pausiert.

Die mit einer Goldschicht versehenen Proben wurden anschließend mit einem REM des Typs 1810 von Amray für Aufnahmen mit 200- bis 5.000-facher Vergrößerung und mit einem Ultra 55 der Firma Carl Zeiss NTS für eine bis zu 50.000-fachen Vergrößerung untersucht. Zudem wurden die Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung verwendet, um diese mit der Messung mittels Laserbeuger zu vergleichen. Die Analyse erfolgte anhand der Software ImageJ, mit deren Hilfe die Durchmesser von mindestens 2000 Partikeln pro Probe vermessen wurden. Die Werte können dann als Anzahlverteilung aufgetragen werden. Zum Vergleich mit den Ergebnissen des Mastersizers wurde die Anzahlverteilung unter der Annahme runder Partikeln in eine Volumenverteilung umgerechnet.

3.2.9.3 Optische Untersuchungen zur Kapselstruktur und Freisetzungsmechanismus mittels Konfokalmikroskopie

Die Analyse des Kapselinneren ist von Interesse, um eine Aussage über die Verteilung der Stoffe innerhalb eines Partikels treffen zu können. So soll aufgeklärt werden, ob die Stoffe homogen in der Kapsel verteilt sind und auf welche Weise die Freisetzung erfolgt. Eine Methode, die den Blick in einen Partikel ermöglicht, ist die Konfokalmikroskopie. Bei ihr wird die Fluoreszenz einer Probe nur aus einem fokussierten Bereich detektiert, da eine Lochblende im Strahlengang das Licht außerhalb des Fokus blockiert. Aus den Fokuspunkten können dadurch Bilder von Ebenen im Inneren einer Probe erzeugt werden. Dazu wurde einem Lichtmikroskop ein konfokaler Kopf des Modells CSU10B-F350-E-RGBA der Firma Yokogawa aufgesetzt. Dieser arbeitet mit einer Nipkow-Scheibe zur Echtzeit-Erstellung konfokaler Aufnahmen. Zur Anregung dient ein Argon-Laser, der Licht in einem Bereich von 457 - 568 nm Wellenlänge emittiert. Das verwendete Filtersystem besteht aus einem Anregungsfilter mit einem Transmissionsbereich von 530 - 620 nm, einem dichroitischen Spiegel mit einem Transmissions- und Reflexionsbereich von 585 - 612 nm bzw. 580 - 620 nm und einem Emissionsfilter mit einer Transmission von 585 - 612 nm. Die konfokale Einheit wurde in Kombination mit dem Axioplan Lichtmikroskop der Firma Carl Zeiss verwendet. Um die Tiefe der fokussierten Ebene zu steuern, diente ein Piezo-Stepper vom Typ E-662 von Physik Instrumente, der die Einstellung der Fokusebene mit einer Genauigkeit von 0,1 µm ermöglichte.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Konfokalmikroskopie zu dem Zweck verwendet, die Benetzung der Kapsel in Wasser zu beobachten. Damit die

Einlagerung von Wasser in die Partikeln sichtbar ist, wurde der Farbstoff Rhodamin B verwendet. Es handelt sich dabei um einen sehr gut wasserlöslichen Fluoreszenzfarbstoff mit einem Absorptionsmaximum von 540 - 560 nm und einem Emissionsmaximum von 625 nm. Im Versuch wurden 20 mg des zu untersuchenden Kapselpulvers auf einen Rundfilter gegeben und fünf Minuten lang mit einer Rhodamin B Lösung ($5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$) gespült. Anschließend wurden die Partikeln auf dem Filter mit 10 ml VE-Wasser gewaschen, um überschüssigen Farbstoff zu entfernen. Zum Schluss wurden die Filter an der Luft getrocknet, ehe einzelne Kapseln vom Filter genommen und auf Objektträger überführt wurden.

3.2.9.4 Optische Untersuchung und Auswertung des Sprühbelags

Die Untersuchungen der mit Kapseln beschichteten Trägerplatten erfolgten mit einem Stereomikroskop SZX16 der Firma Olympus. Zur makroskopischen Betrachtung wurden Aufnahmen bei 7-facher Vergrößerung angefertigt. Sie dienten zur optischen Beurteilung der Homogenität des Sprühbelags. Zur detaillierten Auswertung der Versuche war eine statistische Bewertung der Partikelanzahl pro Platte erforderlich. Hierfür wurden mindestens 20 Aufnahmen bei 32-facher Vergrößerung angefertigt. Mit der Software ImageJ wurde die Anzahl der anhaftenden Partikeln automatisch bestimmt.

Zur statistischen Beurteilung der Versuchsergebnisse wurde die Statistiksoftware Project R verwendet. Dabei wurde zunächst der Shapiro-Wilk-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung der Messwerte durchgeführt. Ein positiver Test ist die Voraussetzung, um einen Vergleich der verschiedenen Versuchsansätze mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) durchführen zu können. Bei dieser wurden der p-Wert und der F-Bruch bestimmt. Für $p < 0,05$ wurde die Aussage zu den jeweiligen Platten als signifikant bewertet. Der F-Bruch ist die Division der Standardabweichung zwischen den Gruppen und innerhalb der Gruppe. Falls die Platten unterschiedlichen Gruppen angehören, ergibt sich ein F-Wert > 1 .

3.2.10 Beurteilung der biologischen Wirksamkeit anhand von Blattscheibenversuchen

Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit wurden vom Staatlichen Weinbauinstitut in Freiburg anhand des Erregers des Falschen Mehltaus im Wein (*Plasmopara viticola*) durchgeführt. Es wurden junge, gleichalte Blätter von unbehandelten Pflanzen der Sorte Müller-Thurgau oder

Gutedel zunächst mit destilliertem Wasser gewaschen und mit Ethanol desinfiziert. Mit einem Korkbohrer wurden kreisrunde und gleichgroße Blattscheiben ausgestanzt, die in eine Petrischale mit sterilem Wasseragar (1 % Agar-Agar) so platziert wurden, dass die Blattunterseite nach oben zeigte. Pro Behandlung wurden jeweils 36 Blattscheiben verwendet. Die Ausbringung der Kapselsuspensionen erfolgte anschließend mit einem automatischen Applikationsgerät der Firma Schachtner (siehe Abbildung 18), bei dem eine Flachdüse über die Blattscheiben mit einer Geschwindigkeit von $2,5 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ hinwegfuhr und dabei ca. $6 \text{ ml}\cdot\text{m}^{-2}$ des Mittels ausbrachte.

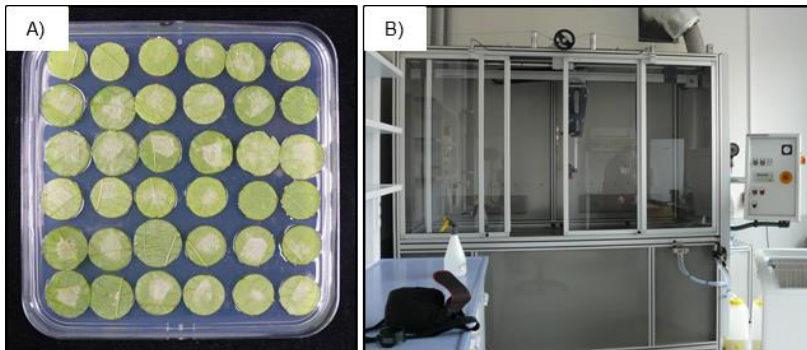


Abbildung 18: A) Blattscheiben einer unbehandelten Kontrolle nach sieben Tagen Inkubation
B) Automatische Applikationsapparatur der Firma Schachtner

24 Stunden nach Applikation erfolgte die Infektion der Blattscheiben. Von eingefrorenen mit Falschem Mehltau befallenen Blättern wurden die Sporangienträger mit sterilem Wasser abgewaschen und die Zelldichte auf ca. $35.000 - 40.000 \text{ Sporen}\cdot\text{ml}^{-1}$ verdünnt. Zur Infektion wurden je $80 \mu\text{l}$ der Sporangiensuspension auf die Blattscheiben pipettiert. Im Anschluss wurden die Petrischalen in einem Klimaraum bei $24 \text{ }^\circ\text{C}$ mit einem Tag-Nachtrythmus von 14 h zu 10 h für 5 - 7 Tage inkubiert. Zur Auswertung der Befallsstärke wurden die Platten fotografiert und der Anteil der befallenen Fläche pro Blattscheibe mit der Software ImageJ bestimmt. Um die Varianten untereinander vergleichen zu können, wurde der Wirkungsgrad nach Abbott (WG_{Abbott}) verwendet, der sich wie folgt berechnet:

$$WG_{\text{Abbott}} = 1 - \frac{Y_n}{X_n} \quad (9)$$

Dabei beschreibt Y_n den Befall der jeweiligen Behandlung und X_n dem Befall der Kontrolle. Um Unterschiede zwischen den Versuchen statistisch zu bewerten, wurde der Mann-Whitney Rangsummentest durchgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Entwicklung eines mikroverkapselten Pflanzenschutzmittels ist, wie unter Kapitel 2.3 beschrieben, ein sehr aufwendiger und komplexer Prozess. Kleinste Veränderungen in der Kapselzusammensetzung können die Produkteigenschaften immens verändern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb versucht, die Auswirkungen der einzelnen Kapselkomponenten auf die Produkteigenschaften aufzuzeigen und somit die optimale Formulierung Schritt für Schritt zu entwickeln. Die möglichen Kapselkomponenten sind nach ihrer Rolle in der Formulierung aufgliedert. Begonnen vom Matrixmaterial werden im Laufe dieses Kapitels weitere Additive wie Emulgatoren und Antioxidanten hinzugefügt und ihre Auswirkungen auf die physikalischen Eigenschaften des Produkts untersucht. Eine Auswahl entwickelter Rezepturen wird abschließend mithilfe von Blattscheibenversuchen miteinander verglichen, um die wirksamste Variante herauszufinden.

4.1 Auswahl geeigneter Matrixmaterialien

Das Matrixmaterial ist nach Definition der Hauptbestandteil der Kapsel. Infrage kommen verschiedene Lipide, die sich in erster Linie in ihrem Schmelzbereich und der Polarität unterscheiden. Die Auswahl eines geeigneten Matrixmaterials erfolgte zunächst unter den Kriterien Verkapselungstauglichkeit (bzw. Fließverhalten des Pulvers) und der Stabilität der Wirkstoffe. Die Hopfenstoffe wurden mit den in Kapitel 3.1.1 beschriebenen Lipiden in der Batchanlage verkapselt, wobei die Temperatur des Heizbades an den Schmelzbereich des Matrixmaterials angepasst wurde. Die Kapseln setzten sich in den Versuchen aus 70 % Matrixmaterial und 30 % Hopfenextrakt zusammen.

4.1.1 Verkapselungstauglichkeit verschiedener Materialien

Zunächst wurde geprüft, ob sich die ausgewählten Matrixmaterialien zum Herstellen von Mikrokapseln mittels Sprüherstarrung eignen. Dazu muss der Stoff ausreichend verflüssigt werden können, damit ein Sprühen überhaupt möglich ist. Zudem ist ein schnelles Erstarren der Partikeln wünschenswert, um Ablagerungen im Sprühturm zu vermeiden. Als letztes Kriterium soll die Rieselfähigkeit beurteilt werden.

Auch wenn in einem Patent aus dem Jahr 1989 [88] PEGs und Schellack als mögliche Matrixmaterialien für die Sprüherstarrung aufgeführt sind, war es im Rahmen der verwendeten Methode nicht möglich, diese Stoffe zur Verkapselung zu verwenden. Schellack konnte nicht genügend verflüssigt werden, PEG 2000 dagegen konnte gesprüht werden, jedoch erstarrten die Partikeln nur sehr langsam. Es bildeten sich sehr klebrige Klumpen mit einer sehr geringen Ausbeute aufgrund von Ablagerungen im Sprühturm. Auch die Verwendung von Softenol 3995, einem Mono-/ Diglycerid auf Rapsölbasis, konnte aufgrund einer sehr hohen Klebrigkeit ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 19 A). Für alle weiteren Matrixmaterialien konnten Pulver mit akzeptabler Fließfähigkeit erhalten werden (siehe Abbildung 19 B).

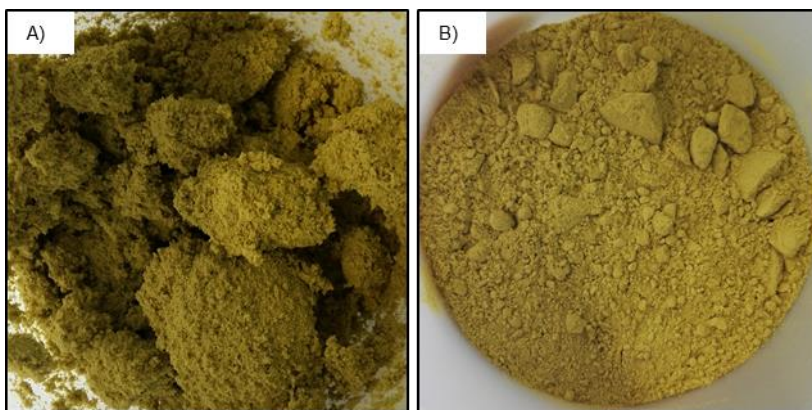


Abbildung 19: A) Hopfenextrakt-Kapseln mit dem Matrixmaterial Softenol 3995
B) Fließfähiges Kapselpulver mit gehärtetem Sonnenblumenöl

Tendenziell wurde festgestellt, dass die Fließfähigkeit für höherschmelzende Fette zunimmt und Wachse generell klebriger Pulver entstehen lassen. Die starke Klebrigkeit der Kapseln mit Softenol 3995 könnte auf die erhöhte Polarität zurückzuführen sein. Dadurch sind Wassereinlagerungen in den Zwischenräumen der Partikeln oder eine inhomogene Mischung des Extrakts mit dem Lipid denkbar.

4.1.2 Wirkstoffstabilität in Lipidpartikeln

Nach ihrer Produktion wurden die fließfähigen Kapselpulver auf ihren Wirkstoffgehalt untersucht. Zur Vereinfachung wurde ausschließlich die Stabilität der Lupulone betrachtet, da es sich dabei um die empfindlichsten Substanzen handelt. Der Anteil der verbliebenen Lupulone nach der Produktion ist in Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Anteil der verbliebenen Lupulone in Kapseln mit den untersuchten Matrixmaterialien und Produktionstemperaturen

Matrixmaterial	Sprühtemperatur / °C	Verbl. Lupulone
Softenol 3169	80	86 %
gehärtetes Rapsöl	80	85 %
gehärtetes Sonnenblumenöl	80	92 %
gehärtetes Rizinusöl	110	80 %
Stearinsäure	80	86 %
Palmitinsäure	80	88 %
Carnaubawachs	130	1 %
Bienenwachs	80	3 %

Die Mehrzahl der verwendeten Lipide zeigt eine hohe Stabilität der Lupulone von mehr als 80 %. Es lässt sich dabei keine Tendenz zwischen einfachen Lipiden (Fettsäuren) und Acyllipiden feststellen. Besonders auffällig ist jedoch die schlechte Wirkstoffstabilität der untersuchten Wachse. Dies könnte daran liegen, dass es bei den Produktionsbedingungen zur Oxidation der Lupulone durch Luftkontakt oder durch die Reduktion der im Wachs enthaltenen Ester kommen konnte. Wachse können deshalb als Matrixmaterial ausgeschlossen werden. Den besten Wert erzielte das gehärtete Sonnenblumenöl mit 92 %. Grund dafür könnte der natürlich hohe Gehalt des Antioxidans α -Tocopherol sein. Literaturangaben beziffern den Anteil in Sonnenblumenöl zwischen 300 – 590 mg/kg (zum Vergleich ca. 120 mg/kg in Rapsöl) [64, S. 238][89][90]. Da die Lupulone während der Produktion aber auch in Kapseln aus reinen Fettsäuren (Stearin- bzw. Palmitinsäure) stabil sind, ist der Einfluss des natürlichen Tocopherols als sehr gering einzuschätzen. Den geringsten

Wert der TAGs weist das gehärtete Rizinusöl auf, was sich auf die erhöhte Produktionstemperatur von 110 °C zurückführen lässt.

Letztendlich zeigen die Versuche, dass während der Sprüherstarrung mit Fettsäuren und TAGs nur ein geringer Anteil an Wirkstoff verloren geht. Aufgrund ihres niedrigen Preises und hohen Verfügbarkeit kann die Auswahl zunächst auf TAGs eingeschränkt werden. Im Verlauf der Entwicklung kommen jedoch noch weitere Faktoren (insbesondere die biologische Wirksamkeit) hinzu, weshalb an dieser Stelle noch keine Aussage über das optimale Matrixmaterial getroffen werden kann.

4.2 Entwicklung und Validierung der Methode zur Partikelgrößenbestimmung mittels Laserbeuger

Zur weiteren Formulierungsentwicklung ist die Bestimmung der Partikelgröße unerlässlich. Es muss deshalb eine Methode entwickelt werden, mit der die Kapselgröße einfach und verlässlich bestimmt werden kann. Besonders zur Untersuchung der Dispergierung des Pulvers in Wasser bietet die Analyse mittels Laserbeuger unter der Verwendung einer Nassdispergiereinheit einen vielversprechenden Ansatz. Ziel dieses Kapitels ist es, die benötigten Parameter zur Laserbeugermessung zu bestimmen und das Ergebnis durch einen Vergleich mit der aus der Bildauswertung erhaltenen Partikelgrößenverteilung zu validieren.

4.2.1 Bestimmung der Partikelgröße mittels Bildauswertung

Für die Umrechnung eines Streumusters im Laserbeuger in eine Partikelgrößenverteilung muss zunächst überprüft werden, ob Partikeln mit einem Durchmesser kleiner als 18,6 µm in der Probe enthalten sind. Ist dies der Fall, muss zusätzlich der Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln bestimmt werden. Im Ersten Schritt wurde die Partikelgrößenverteilung von mehreren Varianten mithilfe des in Kapitel 3.2.9.2 beschriebenen optischen Verfahrens erstellt. Vermessen wurden Pulver, die lediglich aus 70 % Matrixmaterial und 30 % Wirkstoff zusammengesetzt waren. Die Kennwerte der mit Bildauswertung bestimmten Anzahlverteilungen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: Kennwerte der Anzahlverteilung von Hopfenextrakt-Kapseln mit verschiedenen Matrixmaterialien

Matrixmaterial	$x_{10,0}$ / μm	$x_{50,0}$ / μm	$x_{90,0}$ / μm
Carnaubawachs	3,2	7,1	21,9
gehärtetes Rapsöl	3,0	7,5	23,1
gehärtetes Sonnenblumenöl	3,8	8,0	25,1
gehärtetes Rizinusöl	3,1	7,3	21,4
Stearinsäure	2,8	5,8	13,8
Palmitinsäure	3,4	6,8	15,5

Bei allen untersuchten Kapselvarianten ist eine sehr große Anzahl von Partikeln unterhalb des Grenzwertes von $18,6 \mu\text{m}$ enthalten. Besonders kleine Partikeln entstanden bei der Verwendung reiner Fettsäuren. Ein $x_{90,0}$ -Wert von $13,8 \mu\text{m}$ bzw. $15,5 \mu\text{m}$ lässt vermuten, dass kaum Partikeln über dem erforderlichen Wert vorliegen. Die geringe Partikelgröße ist auf die niedrige Viskosität der Fettsäuren zurückzuführen, die das Zerfallen des Strahls der Schmelze in kleine Tröpfchen begünstigt. Die weiteren Matrixmaterialien führten zu ähnlichen Partikelgrößen.

Aufgrund der Ergebnisse muss die Mie-Theorie zur korrekten Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Laserbeuger als Grundlage dienen. Dies setzt die Kenntnis des Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln voraus.

4.2.2 Bestimmung des Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln

Um den Brechungsindex der Hopfenextrakt-Kapseln zu bestimmen, wurden die in Kapitel 3.2.4.1 beschriebenen Methoden eingesetzt. Das einfachere der beiden Vorgehen ist die Bestimmung mittels Extrapolation des Brechungsindex von verdünnten Suspensionen (nach Saveyn et al. [84]). Im ersten Versuch wurden Hopfenextrakt-Kapseln mit gehärtetem Rapsöl als Matrixmaterial verwendet. Die Ergebnisse der Messung mittels Abbe-Refraktometer sind in Abbildung 20 dargestellt.

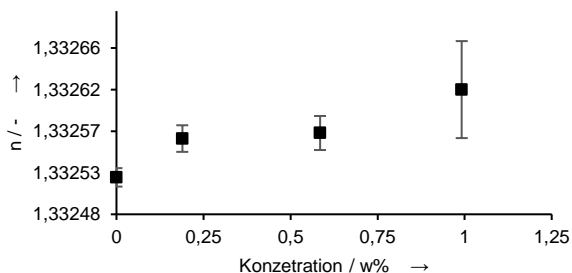


Abbildung 20: Bestimmung des Brechungsindex von Hopfenextrakt-Kapseln aus gehärtetem Rapsöl in VE-Wasser mit 1 w% SDS gemäß der Methode von Saveyn et al.

Die ermittelten Werte zeigten keinen linearen Zusammenhang zwischen Kapselkonzentration und Brechungsindex. Hinzu kommt, dass die Messgenauigkeit bei höherer Konzentration stark abnahm. Deshalb war eine Extrapolation auf einen Wert von 100 % nicht sinnvoll. Weitere Versuche mit anderen Matrixmaterialien zeigten dieselbe Problematik, weshalb diese Methode für die Hopfenextrakt-Kapseln nicht geeignet ist.

Eine alternative Lösung bietet das Abschätzen des Brechungsindex anhand der Methode von Hayakawa et al. [85]. Um ein möglichst aussagekräftiges Ergebnis der iterativen Methode zu erhalten, wurden 13 verschiedene Pulver aus Hopfenextrakt im Mastersizer vermessen und mithilfe der Analysesoftware sowohl Imaginär- als auch Realteil des Brechungsindex variiert. Für den Imaginärteil wurden die Werte 0,01, 0,1 und 1 verwendet. Der Realteil wurde in einem Bereich von 1,350 bis 2,000 mit einer Schrittweite von 0,025 abgeändert. Dabei konnte festgestellt werden, dass der Imaginärteil eine vernachlässigbare Auswirkung unter 0,5 μm auf die Partikelgröße hat. Deshalb wurde er auf 0,1 festgelegt. Im Gegensatz dazu hat der Realteil sehr großen Einfluss auf die berechneten Partikelgrößen. Dies ist beispielhaft bei Kapseln mit Rizinusöl als Matrixmaterial in Abbildung 21 veranschaulicht.

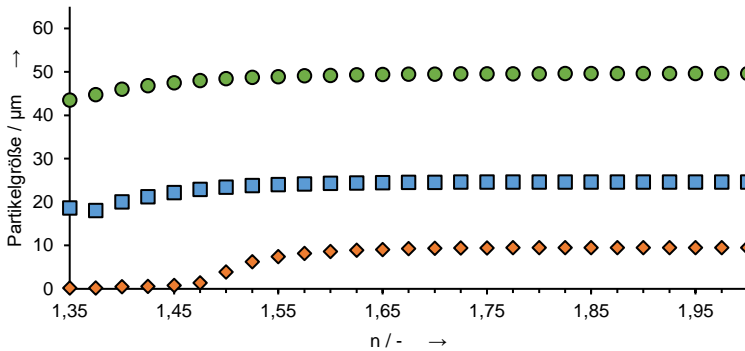


Abbildung 21: Berechnete Werte für $x_{10,3}$ (orange Rauten), $x_{50,3}$ (blaue Quadrate) und $x_{90,3}$ (grüne Kreise) für Hopfenextrakt-Kapseln mit gehärtetem Rizinusöl als Matrixmaterial in Abhängigkeit zum Realteil n des Brechungsindex

Besonders deutlich lassen sich die Abhängigkeiten anhand des $x_{10,3}$ -Werts erkennen. Bei kleinem Brechungsindex ergibt sich ein großer Anteil unrealistisch kleiner Partikeln. Bei Erhöhung des Brechungsindex steigt auch die errechnete Partikelgröße. Ab einem Wert von ca. 1,65 bleiben die gemessenen Kennwerte konstant. Alle 13 untersuchten Varianten zeigten einen optimalen Realteil zwischen 1,6 und 1,775. Damit der Brechungsindex nicht für jede Kapselrezeptur einzeln bestimmt werden muss, wurde der Realteil auf den höheren Wert von 1,775 festgelegt.

4.2.3 Validierung der Messmethode mittels Laserbeuger

Die einzige Möglichkeit, das Ergebnis aus dem Mastersizer auf seine Plausibilität zu überprüfen, ist der Vergleich mit den mittels Bildauswertung erstellten Partikelgrößenverteilungen. Hierfür wurden Dispersionstitrationsen im Laserbeuger mit 13 verschiedenen Varianten durchgeführt und anschließend mit manuell vermessenen REM-Aufnahmen der jeweiligen Varianten verglichen. Zur Übersicht wurden die Kennwerte der jeweiligen Chargen als Mittelwerte zusammengefasst. Sie sind in Abbildung 22 aufgeführt.

4 Ergebnisse und Diskussion

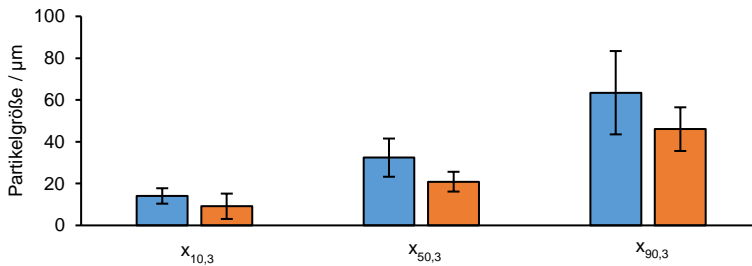


Abbildung 22: Mittelwerte der Bestimmung der Partikelgröße mittels Bildauswertung ■ und Laserbeuger ■

Alle untersuchten Varianten hatten gemeinsam, dass die ermittelten Kennwerte des Laserbeugers stets kleiner waren als die der zugehörigen Bildauswertung. Mit bis zu 50 %-iger Abweichung zwischen den Messverfahren ist die Vergleichbarkeit nicht gegeben. Das Problem wird besonders deutlich bei Betrachtung der Partikelgrößenverteilungen im Detail (siehe Abbildung 23).

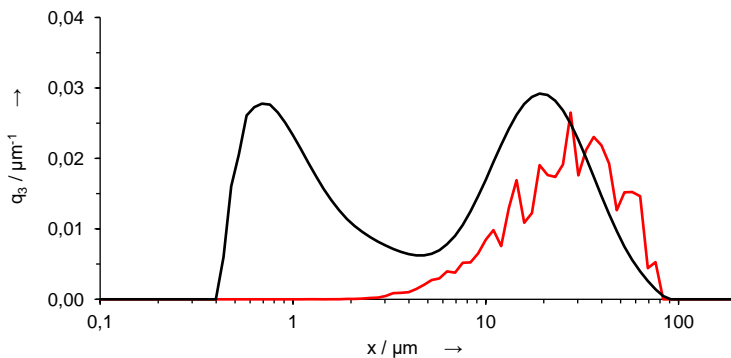


Abbildung 23: Dichteverteilungen von Hopfenextrakt-Kapseln mit gehärtetem Rizinusöl als Matrixmaterial zum Vergleich aus der Bestimmung mittels Laserbeuger (schwarz) und Bildauswertung (rot)

Auffällig ist die bimodale Dichteverteilung der Laserbeuger-Messung. Das erste Maximum der Kurve liegt bei einer Partikelgröße $< 1 \mu\text{m}$, das zweite bei ca. $22 \mu\text{m}$. Im Vergleich mit der Bildauswertung wird klar, dass keine Partikeln kleiner als $2 \mu\text{m}$ auf den REM-Aufnahmen enthalten waren. Es muss sich folglich um Messartefakte handeln, die aufgrund von Zerfall der Kapseln im Ultraschall, Bildung von Emulsionstropfen, optischer Heterogenität der Kapseln [77, S. 279] und inkorrektem Brechungsindex [75, S. 159-163] entstehen können. Die ersten beiden Möglichkeiten konnten anhand von Messungen ohne Ultraschall und einem Vergleich mit einer Trockendispersierung ausgeschlossen werden. Zudem zeigten die

Kapseln im Lichtmikroskop keine auffälligen Inhomogenitäten. Die hohe Anzahl der kleinen Partikeln muss deshalb auf die ungenaue Abschätzung des Brechungsindex zurückzuführen sein. Der Versuch zeigt, dass der gewählte Realteil von 1,775 nicht für jede Kapselzusammensetzung passend ist. Da die Bestimmung des Brechungsindex jeder neuen Kapselrezeptur einen sehr großen Arbeitsaufwand bedeuten würde, wurde die Größe des Messfehlers beurteilt. Um die Auswirkung der Messartefakte auf die Kennwerte der Größenverteilung zu analysieren, wurden Partikeln unter 4 μm aus der gezeigten Verteilung gelöscht. Dadurch erhöhte sich der $x_{50,3}$ -Wert von 19,5 μm auf 21,3 μm . Der entsprechende Wert der Bildauswertung liegt mit 33,7 μm dennoch weit darüber. Der größte Fehler ist deshalb nicht bei der Laserbeuger-Messung zu suchen: Der in Abbildung 23 zu erkennende „zackige“ Verlauf der Bildauswertungskurve ist ein Hinweis darauf, dass die Anzahl der vermessenen Partikeln nicht ausreichend war. Hinzu kommt, dass eine Umrechnung der Anzahl- in die Volumenverteilung nötig war, um die Messmethoden miteinander zu vergleichen. Ein einzelner großer Partikel kann die Kennwerte bereits merklich verändern. Eine weitere Fehlerquelle ist die Tatsache, dass sehr kleine Partikeln anhand der Aufnahmen mit 200-facher Vergrößerung schwer auszuwerten sind und diese durch größere Partikeln oder Agglomeraten verdeckt sind. Die Genauigkeit der Partikelgrößenbestimmung nimmt daher bei kohäsiven Proben stark ab. Dies wird in Abbildung 24 deutlich, in der REM-Aufnahmen eines Hopfenextrakt-Pulvers bei 200- und 2000-facher Vergrößerung dargestellt sind.

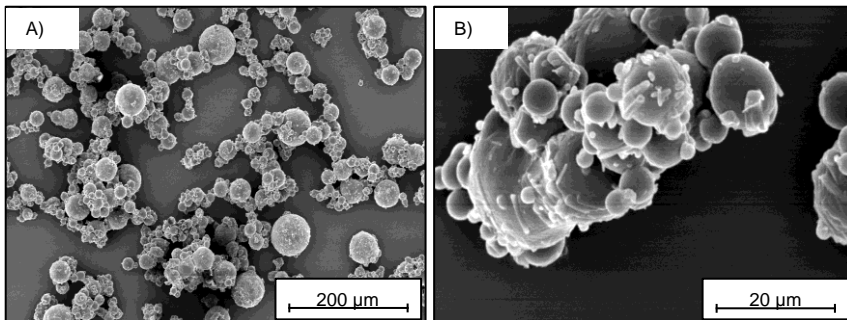


Abbildung 24: REM-Aufnahmen von Hopfenextrakt-Kapseln mit gehärtetem Rizinusöl als Matrixmaterial: A) in 200-facher Vergrößerung und B) Agglomerat in 2000-facher Vergrößerung

Aufgrund des größeren Stichprobenumfangs und der verlässlichen Detektion von kleinen Partikeln liefert die Messung mittels Laserbeuger das genauere Ergebnis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Messverfahren

in erster Linie zur Beobachtung des Dispergierens der Pulver in Wasser verwendet. Das Zerkleinern von Agglomeraten lässt sich am deutlichsten anhand des $x_{90,3}$ -Werts betrachten. Auf diese Kenngröße haben die Messartefakte einen vernachlässigbaren Effekt: Im Beispiel würde sich der Wert durch ein Löschen der Messartefakte von 48 μm auf 49 μm erhöhen. Aus diesem Grund wurde für die Betrachtung des $x_{90,3}$ -Werts der Brechungsindex von 1,775 beibehalten und es wurde keine Nachbearbeitung der Messungen durchgeführt.

4.3 Effekte von Emulgatoren auf die Kapseleigenschaften

Emulgatoren werden den Kapseln für verschiedene Zwecke hinzugefügt. Zum einen sollen sie die Anwendung mittels Feldspritzen ermöglichen, indem sie die Kapseln benetzbar machen und die Suspension stabilisieren. Zum anderen sind sie für die Freisetzung der Wirkstoffe verantwortlich. Im ersten Schritt wurden Kapseln mit je einem Emulgator hergestellt und die Auswirkungen auf die Suspensionsstabilität und die Wirkstofffreisetzung untersucht. Ausgehend davon wurden anschließend verschiedene Kombinationen von Emulgatoren getestet und Untersuchungen zum Mengenverhältnis zwischen Emulgator und Wirkstoff durchgeführt. Zuletzt wurde versucht, anhand verschiedener Methoden den Mechanismus der Wirkstofffreisetzung zu beobachten, um die entscheidenden Einflussgrößen zu identifizieren.

4.3.1 Vergleich einzelner Emulgatoren

Um die Auswirkungen der chemischen Zusammensetzung des Emulgators zu untersuchen, wurden Hopfenextrakt-Kapseln mit 15 % des Additivs hergestellt. Eine Ausnahme stellen die Tenside der C-Reihe dar. Weil ein Lösen dieser Emulgatoren im untersuchten Fett nicht möglich war, wurde Glycol hinzugefügt. Die Substanz dient als kurzkettiges „Co-Tensid“, damit sich inverse Mizellen des Zuckeremulgators bilden können. Die Zusammensetzungen der untersuchten Varianten sind in Tabelle 12 aufgeführt.

Tabelle 12: Zusammensetzung der untersuchten Varianten zum Vergleich einzelner Emulgatoren

Bezeichnung	Softenol 3169	Wirkstoff	Emulgator	Glycasol
ohne Emulgator	70 %	30 %	-	-
C-Reihe	49 %	30 %	15 %	6 %
andere	55 %	30 %	15 %	-

4.3.1.1 Auswirkung auf die Suspensionsstabilität

Begonnen wurde mit der Bestimmung der Suspensionsstabilität. Bei der Auswertung muss beachtet werden, dass die Messmethode nicht für Varianten geeignet ist, bei denen Partikeln auf der Wasseroberfläche aufschwimmen. Ist dies der Fall, sind die Werte erhöht und dürfen nicht mit absinkenden Pulvern verglichen werden. In Abbildung 25 sind Proben, die zum Aufschwimmen neigten, in Rot, miteinander vergleichbare Pulver in Blau dargestellt.

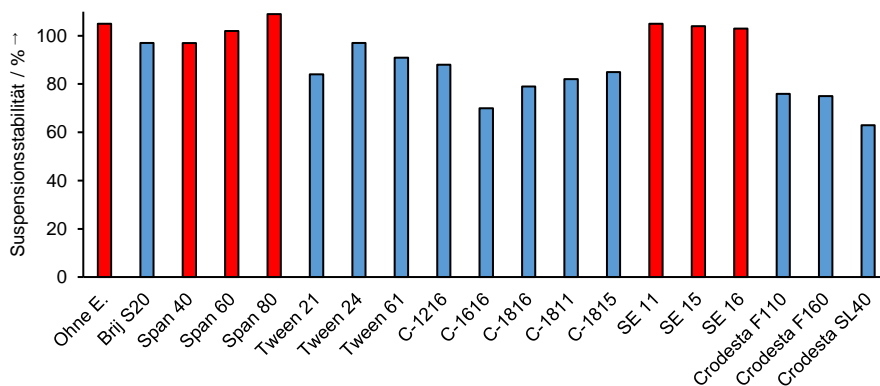


Abbildung 25: Suspensionsstabilität von Hopfenextrakt-Kapseln mit Softenol 3169 als Matrixmaterial und verschiedener Emulgatoren. Aufschwimmende Varianten sind in Rot dargestellt

Bei Betrachtung der Suspensionen konnte beobachtet werden, dass in allen Proben sedimentierende Kapseln enthalten sind. Dies bedeutet, dass die Dichte der Hopfenextrakt-Kapseln höher als die Dichte von Wasser ist. Dennoch schwimmt ohne den Einsatz von Emulgatoren ein großer Teil des Pulvers auf. Dies liegt daran, dass Agglomerate durch mangelnde

Benetzung nicht aufgebrochen werden können und Luftporen bestehen bleiben. Auch die Emulgatoren der Span- und SE-Reihe zeigten das gleiche Verhalten, weshalb die Werte nicht für einen Vergleich verwendet werden können. Die Suspensionsstabilitäten der übrigen Pulver lagen zwischen 63 % (Crodesta SL40) und 97 % (Brij S20). Der hohe Wert der Variante mit Brij S20 kann auf Schaumbildung zurückgeführt werden. Im Schaum enthaltene Partikeln werden zusätzlich an der Sedimentation gehindert, weshalb die Suspensionsstabilität erhöht ist. Generell kann mithilfe der blau markierten Emulgatoren der von der WHO geforderten Wert von 60 % erreicht werden.

Damit die Emulgatoren einen Effekt auf die Benetzbarkeit bzw. Suspensionsstabilität der Kapseln haben können, müssen sie auf der Oberfläche der Partikeln vorliegen bzw. herausgelöst werden. Im Versuch konnte dies für fast alle Varianten nachgewiesen werden, da sie sich vom Pulver ohne Emulgator unterschieden. Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl der HLB-Wert als auch die Zusammensetzung des Emulgators die Suspensionsstabilität der Pulver beeinflussen. Die Spanreihe ist mit HLB-Werten zwischen 4,3 und 7 ungeeignet für die Benetzung der Fettpartikeln. Bessere Ergebnisse wurden mit höheren HLB-Werten erzielt, was darauf hinweist, dass sich die emulgatorhaltigen Lipidpartikeln wie O/W-Emulsionen verhalten. Dennoch lässt sich keine eindeutige Verbindung zwischen der Höhe des HLB-Werts und der Suspensionsstabilität feststellen. Während in der Tween-Reihe der höchste HLB-Wert (Tween 24, HLB 17) das beste Ergebnis erzielte, war es bei der Crodesta-Reihe Crodesta F110 mit dem niedrigsten HLB-Wert von 12. Zudem schnitt die SE-Reihe sehr schlecht ab, obwohl sie aus denselben Bausteinen wie die C- und Crodesta-Reihe zusammengesetzt ist und die HLB-Werte in einem hohen Bereich (11 – 15) liegen. Die Begründung muss in der detaillierten Zusammensetzung der Emulgatoren – z.B. Anzahl der gebundenen Fettsäuren – liegen. Diese wird jedoch vom Hersteller nicht angegeben. Anhand der vorliegenden Daten kann deshalb lediglich über die Qualität der Zuckererster geurteilt werden: Mit der C-Reihe konnten die besten Suspensionsstabilitäten erreicht werden. Zusätzlich sollte anhand der C-Reihe untersucht werden, welchen Effekt die Kettenlänge der Fettsäuren auf die Suspensionsstabilität hat. Die Emulgatoren C-1216, C-1616 und C-1816 haben unterschiedliche Kettenlängen (C₁₂, C₁₆ und C₁₈) bei gleichem HLB-Wert. Auch hier lässt sich kein Zusammenhang feststellen, da der schlechteste Wert mit der mittleren Kettenlänge von C₁₆ gemessen wurde.

Der Test auf Suspensionsstabilität zeigt, dass es (wie in der Literatur beschrieben) notwendig ist, den passenden Emulgator experimentell zu

bestimmen, anstatt ihn anhand des HLB-Wertes auszuwählen [91], da dieser zwar das charakteristische Verhalten, aber nicht die Effizienz der Stabilisierung beschreibt [92]. Dennoch muss auch die Messmethode selbst kritisch betrachtet werden. Es handelt sich um ein sehr schnelles und einfaches Verfahren, um zu kontrollieren, ob die Suspensionsstabilität über 60 % liegt. Die Messgenauigkeit ist jedoch sehr gering: Während der Standzeit im Messzylinder kann es z.B. durch Sonneneinstrahlung oder Temperaturschwankungen im Raum zu Konvektionsströmungen kommen, die das Ergebnis verfälschen. Weiterhin spielt die Kapseldichte eine wichtige Rolle bei der Sedimentationsgeschwindigkeit. Wie sich die Emulgatoren auf die Dichte der Matrixkapseln auswirken, wurde nicht untersucht. Das Fazit an dieser Stelle ist deshalb, dass mit einigen der untersuchten Emulgatoren die minimalen Anforderungen erfüllt werden können. Eine genauere Beurteilung muss durch weitere Kriterien erfolgen.

4.3.1.2 Auswirkung auf die Wirkstofffreisetzung

Die Freisetzung der Wirkstoffe in Wasser wurde mit der unter Kapitel 3.2.3 beschriebenen Probenvorbereitung und Messmethode bestimmt. Die Ergebnisse für die absolut freigesetzte Wirkstoffmengen sind in Abbildung 26 zusammengefasst. Die maximal mögliche Menge betrug im Versuch 256 mg (67 mg Lupulone, 170 mg Humulone und 19 mg Xanthohumol).

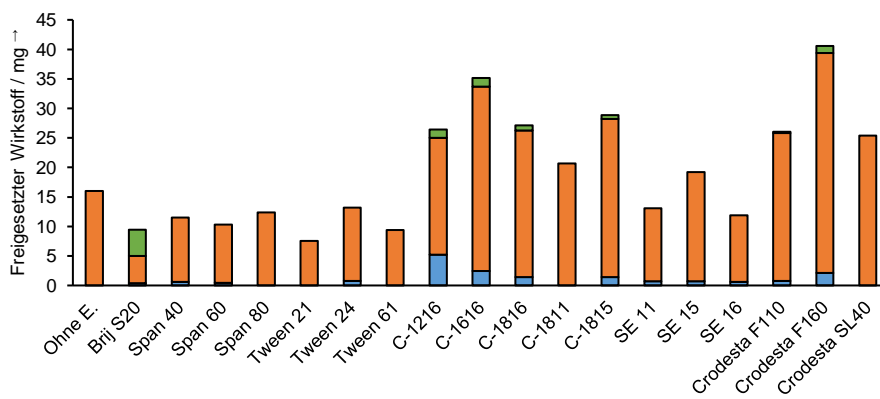


Abbildung 26: Freigesetzte Wirkstoffmenge von Hopfenextrakt-Kapseln mit Softenol 3169 als Matrixmaterial und verschiedenen Emulgatoren: Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Ohne zugefügten Emulgator lösen sich ausschließlich Humulone aus der Kapsel. Es konnte eine Freisetzung von ca. 16 mg gemessen werden, was im Wasser einer Konzentration von 0,2 g/l entspricht und damit weit unter der Löslichkeitsgrenze von 3,5 g/l liegt. Die Freisetzung der Kapseln mit

Emulgatoren der Span-, Tween- und SE-Reihe zeigten keine Verbesserung der Humulon-Freisetzung, sondern teilweise sogar negative Auswirkungen. Auffällig ist, dass Brij S20 selektiv die Freisetzung von Xanthohumol ermöglichte, während die Humulone zu geringerem Anteil herausgelöst wurden. Bei dieser Variante wurden 24 % des verkapselten Xanthohumols im Wasser nachgewiesen. Die insgesamt höchste Freisetzung konnte bei Crodesta F160 gemessen werden. Die meisten Lupulone wurden aus Kapseln mit C-1216 herausgelöst.

Legt man den in Kapitel 2.3.4.3 beschriebenen Mechanismus zum Herauslösen von Wirkstoffen aus Lipidpartikeln zugrunde, zeigt der Versuch mit Kapseln ohne Emulgator, dass ein Schwellen der Kapsel auch ohne Zusatzstoffe möglich ist. Es konnten ca. 9 % der verkapselten Humulone im Lösungsmittel nachgewiesen werden. Zwar liegen die Wirkstoffe bei Matrixkapseln auch auf der Partikeloberfläche vor, jedoch lässt die Höhe des Werts vermuten, dass ein geringer Anteil der Humulone aus dem Kapselinneren herausdiffundiert. Es wurden ausschließlich die α -Säuren freigesetzt, da sie die höchste Löslichkeit in Wasser aufweisen. Für die Lupulone und Xanthohumol reicht die Schwellung aufgrund der schlechten Löslichkeit nicht aus.

Die Zugabe von Emulgatoren hatte gegensätzliche Wirkungen. Eine schlechtere Freisetzung gegenüber der Kontroll-Variante ohne Emulgator erscheint auf den ersten Blick verwunderlich. Da die Kapseln zur Freisetzung der Wirkstoffe zunächst benetzt werden müssen, wurde erwartet, dass Varianten mit guter Suspendierbarkeit auch mehr Inhalt freigeben. Dass dies nicht der Fall ist, wird v.a. bei der Variante mit Brij S20 deutlich. Das Pulver ließ sich in Wasser sehr gut dispergieren, setzte jedoch sehr wenig Wirkstoff frei. Eine Möglichkeit für diesen Gegensatz ist, dass sich der Emulgator auf der Kapseloberfläche anordnet und damit einerseits die Benetzbarkeit erhöht, aber andererseits als Diffusionsbarriere agiert. Dies scheint ebenfalls für die Tween-Reihe zu gelten. Anders verhält es sich bei den Zucker-Fettsäure-Estern. Scheinbar können sich die Emulgatoren von der Fettmatrix lösen und die Wirkstoffe im Wasser solubilisieren. Theoretisch sollte innerhalb einer homologen Reihe eines Emulgators die Solubilisierung bei längerem hydrophoben Rest erhöht sein [48, S. 51]. Dies konnte bei den Hopfenextrakt-Kapseln nicht bestätigt werden. Bei der C-Reihe konnte kein Zusammenhang zwischen Kettenlänge und Freisetzung festgestellt werden.

Zuletzt lässt sich anhand der durchgeführten Versuchen folgern, dass die chemische Struktur des Emulgators bestimmt, welcher Wirkstoff bevorzugt freigesetzt wird. Grund dafür ist vermutlich, dass sich die

Wirkstoffe schon während des Herstellungsprozesses in der Schmelze an die lipophilen Bereiche bestimmter Emulgatoren anordnen. Entscheidend ist, ob der Wirkstoff zusammen mit dem Emulgator bei Kontakt mit Wasser von der Fettmatrix gelöst und in die Mizellen eingebaut werden kann. Dies geschieht zum Beispiel bei Kapseln mit dem Emulgator Brij S20, welcher sich besonders gut zum Herauslösen von Xanthohumol eignet, und bei Crodesta SL40 v.a. im Hinblick auf die Humulone.

In den Versuchen wurden maximal 16 % der enthaltenen Wirkstoffe aus den Kapseln freigesetzt. Da es sich um Matrixkapseln handelt, ist davon auszugehen, dass die Wirkstofffreisetzung nach der im gezeigten Versuch gemessenen initialen Menge stark abnimmt und ein Großteil der Wirkstoffe ungenutzt im Inneren der Partikeln zurückbleibt. Weitere Maßnahmen müssen deshalb getroffen werden, um das Herauslösen zu verbessern.

4.3.2 Kombination von Emulgatoren

Die einzelnen Emulgatoren begünstigen selektiv die Freisetzung bestimmter Wirkstoffe. Um das Herauslösen aller Komponenten des Hopfenextrakts zu ermöglichen, soll in diesem Kapitel geklärt werden, ob durch die Kombination mehrerer Emulgatoren in der Kapsel auch ihre Auswirkungen auf die Produkteigenschaften addiert werden können. Dies soll am Beispiel der Emulgatoren Brij S20 und Crodesta F160 gezeigt werden. Dazu wurde eine Variante produziert, in welcher beide Emulgatoren zu je 15 % enthalten sind. Der Rest der Kapsel setzt sich aus 40 % Softenol 3169 und 30 % Hopfenextrakt zusammen. Die Resultate für die Suspensionsstabilität und die Wirkstofffreisetzung sind in Abbildung 27 dargestellt.

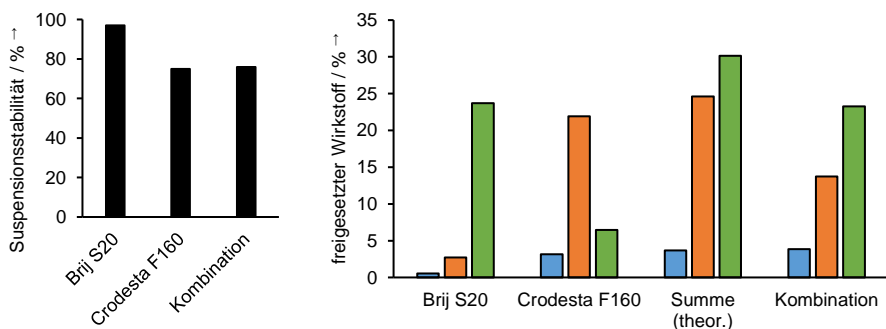


Abbildung 27: Suspensionsstabilität (links) und freigesetzte Wirkstoffe (rechts) von Hopfenextrakt-Kapseln mit den Emulgatoren Brij S20 und Crodesta F160 im Vergleich zur Kombination der beiden Emulgatoren. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Die Suspensionsstabilität der Kombination ist geringer als die der Variante mit Brij S20 allein und liegt auf dem Niveau der Variante mit Crodesta F160. Wie bereits beschrieben, resultierte der hohe Wert bei Brij S20 durch Schaumbildung. Bei der Kombination blieb diese aus, weshalb mehr Partikeln sedimentierten. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass sich Mischmizellen aus den beiden Emulgatoren mit neuen Eigenschaften bildeten. Obwohl die Viskosität des Fluids bei einer Erhöhung der Emulgatormenge zunimmt [93], konnte keine deutliche Verringerung der Sinkgeschwindigkeit bzw. Verbesserung der Suspensionsstabilität erreicht werden.

Bei Betrachtung der Freisetzung können mehrere Effekte festgestellt werden. Im Gegensatz zur Variante mit Brij S20 zeigt die Kombination der Emulgatoren eine erhöhte Lupulon- und Humulon-Freisetzung. Die Freisetzung von Xanthohumol bleibt unverändert. Im Vergleich zur Variante mit Crodesta F160 wurden weniger Humulone, dafür mehr Xanthohumol freigesetzt. Der Vergleich mit der berechneten Summe der Varianten mit je einem Emulgator zeigt, dass die Eigenschaften der Emulgatoren nicht summiert werden können. Dies stützt die Vermutung, dass Mischmizellen mit neuen Eigenschaften entstehen. Brij S20 eignet sich sehr gut zum Herauslösen von Xanthohumol, verringert jedoch die Humulon-Freisetzung. In der kombinierten Mizelle lösen sich dank des Zucker-Fettsäure-Esters mehr Lupulone und Humulone. Betrachtet man die insgesamt freigesetzte Menge, so fällt auf, dass im Vergleich zu Crodesta F160 (40,6 mg) in der Kombination (30,3 mg) 10,3 mg weniger Wirkstoff gelöst wurde. Die Hohe Differenz liegt an der bevorzugten Humulon-Freisetzung mit Crodesta F160, da die Wirkstoffgruppe den größten Anteil im Hopfenextrakt ausmacht.

Bedenkt man, dass die Emulgatormenge in der Kapsel verdoppelt wurde, ist der Nutzen einer Kombination aus Emulgatoren fraglich, da der erhoffte synergistische Effekt ausblieb. Zudem bewirkte der hohe Anteil der Emulgatoren bzw. der geringe Anteil des Matrixmaterials eine hohe Klebrigkeit des Pulvers. Zur Verbesserung der Kapselrezeptur muss die optimale Beladung der Kapsel mit Wirkstoff und Emulgator gefunden werden.

4.3.3 Einstellung der Mengenverhältnisse

Die Mengenverhältnisse zwischen Hopfenextrakt und Emulgatoren innerhalb der Kapseln müssen korrekt eingestellt werden, weil sonst die Gefahr besteht, dass entweder Wirkstoffe im Kern der Kapsel verloren gehen oder Emulgator im Überschuss eingesetzt wird. Hierfür wurde zunächst der Emulgatoranteil, dann die Wirkstoffbeladung schrittweise reduziert.

Das Herabsetzen der Emulgatormengen innerhalb der Kapseln wurde anhand einer Variante mit Softenol 3169 als Matrixmaterial, 30 % Hopfenextrakt und einer Emulgatorkombination aus Brij S20 und C-1816 mit je gleichem Anteil analysiert. Es wurden Kapseln mit einem (Gesamt-) Emulgatoranteil von 30 %, 15 % und 7,5 % untersucht. Die reduzierten Emulgatoren wurden mit dem Matrixmaterial ersetzt. Die Suspensionsstabilitäten und die freigesetzten Wirkstoffe der Pulver sind in Abbildung 28 zusammengefasst.

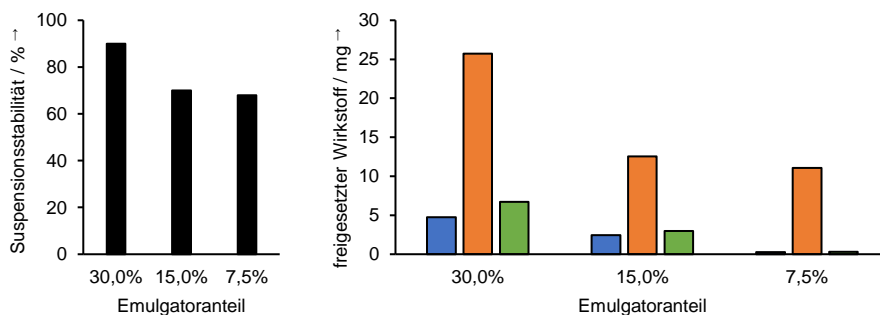


Abbildung 28: Suspensionsstabilität (links) und freigesetzte Wirkstoffe (rechts) von Hopfenextrakt-Kapseln in Abhängigkeit des Emulgatoranteils. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Die Variante mit dem höchsten Emulgatoranteil zeigte die beste Suspensionsstabilität (90 %). Bei Halbierung des Emulgators nahm der

Wert deutlich auf 70 % ab. Eine weitere Halbierung verringerte die Suspensionsstabilität nur noch geringfügig. Der gemessene Wert bei einer Beladung von 7,5 % wurde jedoch durch aufschwimmende Partikeln verfälscht. Die Benetzbarkeit und Suspensionsstabilität stiegen deshalb wie zu erwarten mit der Emulgatormenge an.

Ähnliche Auswirkungen konnten bei der freigesetzten Wirkstoffmenge beobachtet werden. Bei einem Emulgatoranteil von 30 % wurden am meisten Wirkstoffe aus der Kapsel herausgelöst (ca. 37 mg in Summe). Eine Halbierung des Emulgatorgehalts führte auch annähernd zu einer Halbierung des freigesetzten Wirkstoffs auf 18 mg. Dieser Zusammenhang zeigt, dass der Emulgator der limitierende Faktor zur Wirkstofffreisetzung ist. Ein weiteres Reduzieren des Emulgators in der Kapsel führte zu stark verringerter Abgabe der Lupulone und des Xanthohumols, während die Freisetzung der Humulone nur geringfügig beeinflusst wurde. Die Erklärung hierfür ist, dass die Konzentration der Emulgatoren in Wasser zu gering ist, als dass sich die zur Solubilisierung der Lupulone bzw. des Xanthohumols notwendigen Mizellen bilden konnten. Die Humulone sind davon nur schwach betroffen, da sie dank ihrer höheren Löslichkeit selbst bei Kapseln ohne Emulgator herausgelöst werden können.

Die Daten belegen, dass eine höhere Menge Emulgator in der Kapsel sowohl die Suspensionsstabilität als auch die Wirkstofffreisetzung verbessert. Problematisch für Kapseln mit 30 % Emulgatoranteil ist jedoch ihre hohe Klebrigkeit. Zudem konnten lediglich 15 % des gesamt enthaltenen Wirkstoffs herausgelöst werden.

Aus diesem Grund wurde im nächsten Schritt untersucht, wie sich eine Verringerung des Wirkstoffgehalts auf die Kapsel­eigenschaften auswirkt. Dies wurde u.a. an einer Variante mit dem Matrixmaterial Softenol 3169 und der Emulgatorkombination aus Brij S20 (15 %) und C-1816 (15 %) durchgeführt. Die Wirkstoffbeladung wurde von 30 % auf 15 % verringert, wobei der verringerte Anteil mit Matrixmaterial ersetzt wurde. Die Ergebnisse der Suspensionsstabilität und der Wirkstoff­freisetzung der Varianten sind in Abbildung 29 dargestellt.

4.3 Effekte von Emulgatoren auf die Kapseleigenschaften

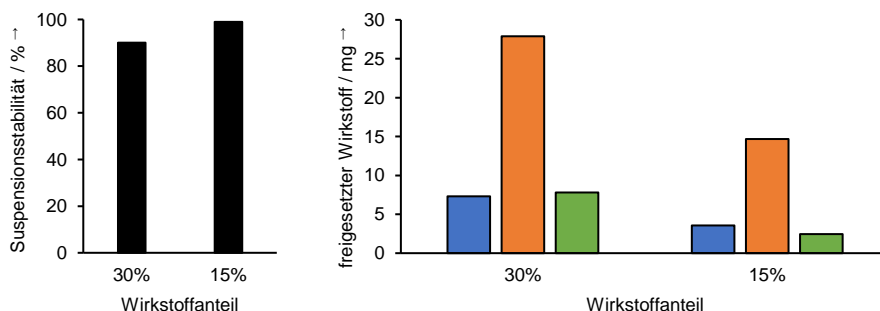


Abbildung 29: Suspensionsstabilität (links) und freigesetzte Wirkstoffe (rechts) von Hopfenextrakt-Kapseln in Abhängigkeit des Wirkstoffanteils. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Die Suspensionsstabilität ist bei einem Wirkstoffanteil von 30 % mit einem Wert von 90 % etwas geringer als die der Variante mit niedrigerem Wirkstoffanteil. Die Variante mit 15 % Hopfenextrakt bildete mit 99 % eine nahezu perfekt stabilisierte Suspension. Die Werte sind allerdings im Rahmen der Messgenauigkeit sehr ähnlich, weshalb kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Wirkstoffbeladung und Sinkgeschwindigkeit erkannt werden konnte. Auch bei weiteren Vergleichsvarianten konnte keine Tendenz erkannt werden. Im Gegensatz dazu besteht ein sehr klarer Zusammenhang zwischen Wirkstoffbeladung und Klebrigkeit der Kapseln: je geringer der Wirkstoffanteil, desto fließfähiger das Pulver. Dies lässt sich dadurch erklären, dass bei Kapseln mit höherer Wirkstoffbeladung eine größere Menge des klebrigen Extrakts auf der Oberfläche vorliegt und zugleich der Anteil des Matrixmaterials verringert ist.

Sehr deutliche Unterschiede konnten bei der Analyse der Freisetzung festgestellt werden. Bei Halbierung der Wirkstoffbeladung von 30 % auf 15 % war ein Rückgang der Freisetzung aller drei Wirkstoffe zu beobachten. Insgesamt verringerte sich die herausgelöste Menge von 43 mg auf 21 mg und verhält sich damit in etwa proportional zum Wirkstoffanteil in der Kapsel. Dieses Verhalten konnte mit einer weiteren Variante bei gleichen Emulgatoren und gehärtetem Rapsöl als Matrixmaterial reproduziert werden (Verringerung von 64 mg auf 31 mg). Die Beobachtungen können mithilfe des in Kapitel 2.3.4.3 gezeigten Mechanismus zur Freisetzung aus Lipidmikropartikeln erklärt werden. Bei Kontakt mit Wasser bildet sich eine Schwellenschicht, indem das Fluid in die Kapselmatrix diffundiert. Erst dies ermöglicht die Freisetzung aus dem Inneren der Kapsel. Die Schwellungsfront breitet sich bei den Varianten vergleichbar aus und ist deshalb abhängig von den Emulgatoren und nicht von der

Wirkstoffbeladung. Da die Wirkstoffe in Matrixkapseln homogen verteilt sind, wird in der gleichen Zeit bei halber Wirkstoffkonzentration im Partikel nur die Hälfte freigesetzt. Dies wird deutlich bei einem Vergleich der prozentual herausgelösten Wirkstoffmenge: Unabhängig von der Beladung werden ca. 15 % der Lupulone und 20 % der Humulone freigesetzt. Nur bei Xanthohumol kann dieser Zusammenhang nicht bestätigt werden, da der freigesetzte Anteil von 50 % nur auf 31 % abfällt. Dies belegt, dass neben der allgemeinen Schwellungsfront auch eine Diffusionsfront für die einzelnen Wirkstoffe existiert. Aufgrund der ausgeprägten Solubilisierung von Xanthohumol mit den verwendeten Emulgatoren liegt die Diffusionsfront weit im Kapselinneren. Ohne Erosion der Kapsel bleibt eine wirkstoffleere äußere Schicht bestehen, welche eine Diffusionsbarriere darstellt. Da die Diffusionsgeschwindigkeit von der Höhe des Konzentrationsunterschieds zwischen Kapselinnerem und Lösungsmittel abhängt, wird bei der Variante mit geringerer Wirkstoffmenge ein geringerer Anteil herausgelöst.

Die Versuche haben gezeigt, dass der Anteil freigesetzter Wirkstoffe durch eine erhöhte Emulgatormenge verbessert werden kann. Eine verringerte Wirkstoffbeladung führte zu fließfähigeren Pulvern und die freigesetzte Wirkstoffmenge verhielt sich nahezu proportional zur Beladung. Abschließend kann gefolgert werden, dass der Emulgator in einer Kapsel mit hoher Wirkstoffbeladung effizienter genutzt wird, da bei gleicher Tensidmenge mehr Wirkstoff freigesetzt werden kann. Eine endgültige Auswahl der Mengenverhältnisse muss jedoch anhand von Versuchen zur biologischen Wirksamkeit getroffen werden.

4.4 Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln

Bereits bei der Untersuchung verschiedener Emulgatoren konnten Vermutungen zum Freisetzungsmechanismus aus den Lipid-mikropartikeln getroffen werden. Um die Zusammenhänge weiter aufzuklären, wurden verschiedene Methoden verwendet. Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in diesem Kapitel zusammengefasst.

4.4.1 Vergleich interner und externer Emulgatorzugabe

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Emulgator und Schwellung der Kapselmatrix wurden Kapseln mit integrierten Emulgatoren und Kapseln ohne Emulgatoren miteinander verglichen. Für die Versuche wurden zwei Rezepturen mit gehärtetem Rapsöl als Matrixmaterial und 15 % Wirkstoffbeladung hergestellt. Bei einer Variante wurde 15 % Brij S20 und 15 % C-1616 in die Kapseln integriert. Die zweite Variante wurde ohne interne Emulgatoren hergestellt. Als Ersatz wurden der Kapselsuspension die auf die Kapselmasse bezogenen Mengen Brij S20 (15 %) und C-1616 (15 %) dem Wasser beigefügt. Die freigesetzten Wirkstoffmengen sind im Vergleich zu einer Variante ohne Emulgator in Abbildung 30 aufgeführt.

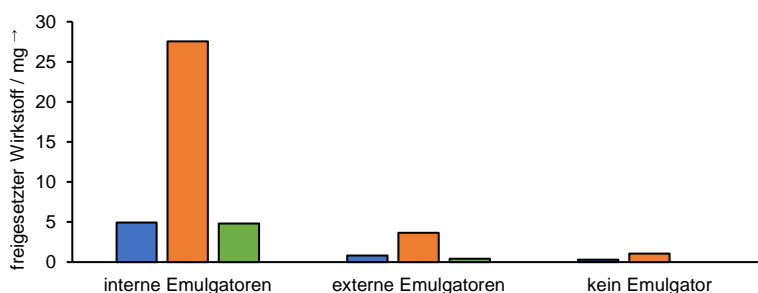


Abbildung 30: Wirkstofffreisetzung von Hopfenextrakt-Kapseln mit internen und extern hinzugefügten Emulgatoren im Vergleich zu einer Variante ohne Adjuvanten. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Bereits beim Anmischen der Suspensionen zeigte sich ein bedeutender Unterschied zwischen den Varianten. Während die Kapseln mit internen Emulgatoren leicht zu dispergieren waren, blieben in der Vergleichsvariante aufschwimmende Agglomerate bestehen. Das Verkapseln der Emulgatoren ist für die Benetzung der Agglomerate von Vorteil, da die Tensidmoleküle nicht erst in die Zwischenräume diffundieren und an der Partikeloberfläche anhaften müssen. Auch bei der Wirkstofffreisetzung ist der Nutzen interner Emulgatoren auf den ersten Blick zu erkennen: Alle Wirkstoffe werden besser freigesetzt als bei den anderen Varianten. Zwar ist auch bei externer Emulgatorzugabe die herausgelöste Wirkstoffmenge mit 5 mg höher als beim Pulver ohne Emulgator (1 mg), aber deutlich geringer als bei der Variante mit internen Emulgatoren (37 mg).

Für ein Herauslösen der Wirkstoffe ist das Eindringen des Lösungsmittel in die Kapselmatrix erforderlich. Ist dies nicht der Fall, können lediglich oberflächennahe Wirkstoffe gelöst werden. Bei den Varianten mit externen Tensiden und ohne Emulgator wird ein sehr kleiner Wirkstoffanteil (5,3 % bzw. 1,6 % der Humulone) freigesetzt. Die geringfügige Verbesserung durch die externe Zugabe von Emulgatoren kann entweder an einer verbesserten Schwellung der Kapsel oder auf die Erhöhung der Löslichkeit der Wirkstoffe zurückgeführt werden. Im Vergleich zur internen Emulgatorzugabe ist der freigesetzte Wirkstoffanteil dennoch sehr gering. Der limitierende Faktor bei externer Emulgatorzugabe muss deshalb die Schwellung der Kapselmatrix sein. Im Gegensatz dazu scheint das Lösungsmittel in Partikeln mit internen Emulgatoren sehr schnell und sehr weit ins Kapselinnere eindringen zu können. Nur so lassen sich die hohen freigesetzten Mengen – z.B. 61 % des verkapselten Xanthohumols – erklären. Dies ist nur möglich, wenn die Schwellungsfront sehr weit ins Kapselinnere vordringen kann.

Um die Vermutungen zu bestätigen, wurden weitere Versuche durchgeführt, mit denen die Schwellung der Kapseln beobachtet werden sollte. Ziel war es, die Diffusion des Lösungsmittels ins Kapselinnere mithilfe der Konfokalmikroskopie sichtbar zu machen. Es wurden deshalb erneut Kapseln mit und ohne internen Emulgator hergestellt. Für die Färbeversuche wurde zudem auf den Wirkstoff verzichtet, da dieser bei der verwendeten Laser-Filter-Kombination fluoreszieren würde. Die Kapseln wurden nach der in Kapitel 3.2.9.3 beschriebenen Methode mit Rhodamin B angefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht. Bei der Färbung der Kapseln ohne internene Emulgatoren wurden diese in die Färbelösung gemischt. In Abbildung 31 sind Aufnahmen der beiden Varianten dargestellt. Der Fokus wurde so eingestellt, dass die Schnittebene durch den Mittelpunkt der Partikeln zu sehen ist.

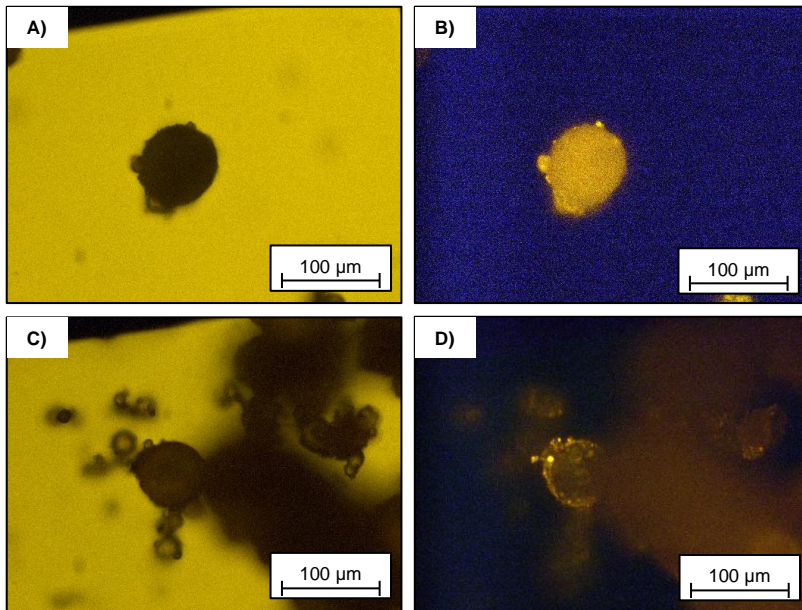


Abbildung 31: Aufnahmen von Kapseln im Konfokalmikroskop: A) Hellfeld bzw. B) Fluoreszenz angefärbter Kapseln mit internen Emulgatoren. C) Hellfeld bzw. D) Fluoreszenz angefärbter Kapseln mit extern zugegebenen Emulgatoren

Bei beiden Varianten konnten die Kapseln mit Rhodamin B angefärbt werden. Die Fluoreszenz der Variante mit internem Emulgator war sehr schwach, weshalb eine sehr lange Belichtungszeit von 72 ms eingestellt wurde. Im Vergleich dazu wurde bei externem Emulgator nur 7 ms lange belichtet. Die unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensitäten können auf die Lage der Emulgatoren und den durchgeführten Waschschritt zurückgeführt werden. Bei internem Emulgator konnte über den gesamten Kapselquerschnitt eine gleichmäßige Anfärbung detektiert werden. Bei der Vergleichsvariante ist der Farbstoff in der äußeren Kapselschicht konzentriert. Dies zeigt, dass die externen Emulgatoren vermehrt auf der Kapseloberfläche vorliegen und zusammen mit dem Lösungsmittel teilweise in die Kapselmatrix eindringen konnten. Obwohl die Pulver lediglich fünf Minuten lang in der Färbelösung dispergiert wurden, konnte der Farbstoff bei Kapseln mit internem Emulgator ohne sichtbaren Konzentrationsgradienten bis ins Zentrum vordringen. Bei dieser Variante breitet sich die Schwellung innerhalb sehr kurzer Zeit über die komplette Kapsel aus und die Freisetzung wird ausschließlich von der Diffusion durch die Matrix kontrolliert. Dies erklärt den hohen Anteil freigesetzten Xanthohumols von 61 % bei dieser Variante. Im Gegensatz dazu dringt das Lösungsmittel bei externer Emulgatorzugabe nur geringfügig in die Matrix

ein, weshalb die Freisetzung durch das langsame Fortschreiten der Schwellungsfront stark eingeschränkt ist. Ergänzende Versuche ohne Emulgatoren haben zu keiner Anfärbung der Kapseln geführt. Ohne Additive konnte demnach keine Schwellung beobachtet werden. Es werden lediglich auf der Oberfläche gelegene Wirkstoffe ins Lösungsmittel abgegeben.

Die Versuche belegen, dass Wasser bei Kapseln mit Brij S20 und C-1616 innerhalb kürzester Zeit bis ins Zentrum vordringen kann. Anhand von Untersuchungen im Laserbeuger und im Mikroskop konnte eine Erosion der untersuchten Variante ausgeschlossen werden. Es kann deshalb die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Freisetzungsrates bei Kapseln mit internem Emulgator von der Diffusion des Wirkstoffs durch die geschwollene Matrix kontrolliert wird.

4.4.2 Freisetzungskinetik

In den vorausgegangenen Kapiteln wurde die Freisetzung punktuell nach zehn Minuten im Wasser bestimmt. Um die Freisetzungskinetik zu bestimmen, müssen Messungen an mehreren Zeitpunkten durchgeführt werden. Die Versuche sollen Aufschluss darüber bringen, wie sich das Herauslösen der Wirkstoffe mit der Zeit verändert. Dies wurde mithilfe von zwei verschiedenen Methoden zur Probenvorbereitung bestimmt. Zunächst wurde ein Versuch unternommen, die initiale Freisetzung möglichst detailliert nachzuverfolgen. Im Anschluss wurde das Herauslösen der Wirkstoffe über mehrere Tage hinweg beobachtet.

Erneut wurde die Kapselvariante mit gehärtetem Rapsöl, 15 % Wirkstoff, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616 verwendet. Da bereits bekannt ist, dass die Schwellung dieser Kapseln innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur vollständig abgeschlossen ist, wurden die Versuche mit 4 °C kaltem Leitungswasser durchgeführt. Dazu wurde die Suspension auf einem Magnetrührer in einem Kühlschrank angesetzt. Mithilfe einer Einmalspritze wurden 5 ml der Suspension nach 1 min, 3 min, 5 min, 7 min und 9 min entnommen und mit den 2 – 3 µm bzw. 0,45 µm Cellulose-Filtern schnellstmöglich filtriert. Die Messung der freigesetzten Menge erfolgte dann standardmäßig mittels Kapillarelektrophorese. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, um ein möglichst genaues Ergebnis zu erhalten. Der Freisetzungsverlauf ist in Abbildung 32 dargestellt.

4.4 Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln

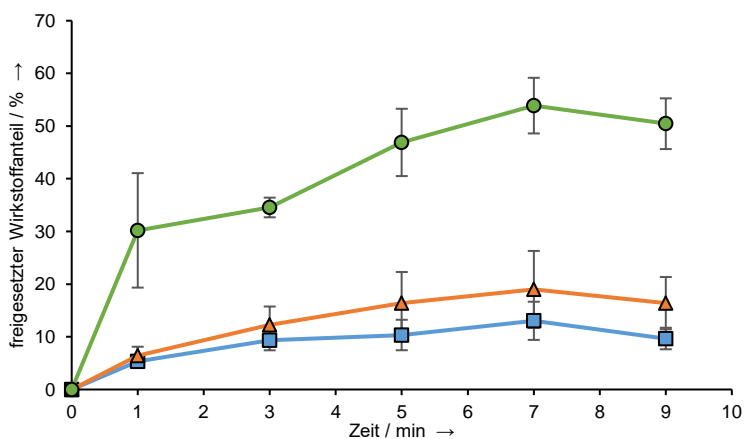


Abbildung 32: Verlauf der Freisetzung in auf 4 °C gekühltem Wasser einer Variante mit gehärtetem Rapsöl und den Emulgatoren Brij S20 und C-1616. Lupulone —■—, Humulone —▲— und Xanthohumol —●—

Die drei Kurven zeigen einen hohen initialen Anstieg innerhalb der ersten Minute. Die Steigung nimmt anschließend ab und kann ab Minute sieben als konstant betrachtet werden. Bei Xanthohumol wurde der höchste Anteil aus der Kapsel gelöst, wobei nach einer Minute bereits etwa 30 % freigesetzt wurden. Über die Versuchsdauer hat sich etwa die Hälfte des enthaltenen Xanthohumols gelöst.

Trotz der niedrigen Temperaturen zeigte sich der für Matrixkapseln typische „Initial Burst“, der für Xanthohumol besonders stark ausfällt. Der schnelle Anstieg lässt vermuten, dass die Schwellung der Kapseln in Wasser innerhalb von Sekunden ablaufen musste. Auch die Diffusionsfront scheint sich anfangs sehr schnell ins Kapselinnere bewegt zu haben. Sie verlangsamte sich jedoch sehr schnell und nach ca. sieben Minuten war im Versuch keine Veränderung mehr festzustellen. Ab diesem Zeitpunkt wird die Diffusion durch die leeren Außenschichten der Kapseln verhindert. Anschlussversuche über einen längeren Zeitraum von bis zu fünf Tagen haben gezeigt, dass tatsächlich weiterhin geringe Mengen Wirkstoff freigesetzt werden. Allerdings kam es parallel zu einem Abbau der Substanzen, weshalb keine aussagekräftigen Ergebnisse im Hinblick auf die Freisetzungskinetik gewonnen werden konnten. Dennoch zeigt der Versuch, dass die untersuchten Hopfenextrakt-Kapseln dem unter Kapitel 2.3.1.3 beschriebenen Freisetzungsverlauf in Abhängigkeit von \sqrt{t} folgen.

Wie bereits im Grundlagenteil beschrieben, kann das gemessene Freisetzungsprofil für die langanhaltende Wirkung des Pflanzenschutz-

mittels von Vorteil sein, da beim Anrühren der Kapselsuspension eine hohe Wirkstoffkonzentration in Lösung erreicht wird. Die Menge der herausgelösten Wirkstoffe muss von Beginn an oberhalb der letalen Dosis für den Erreger liegen, um einen Schutz zu gewährleisten. Die anschließende langsame Freisetzung könnte ausreichen, um die Konzentration auf dem Blatt aufrecht zu erhalten. Dies muss anhand von Biotests untersucht werden. Lässt die Wirkung aufgrund mangelnder Wirkstoffkonzentration nach kurzer Zeit nach, müssen Kapseln verwendet werden, bei denen es durch Erosion oder Auflösen zum Abtrag der wirkstoffleeren Außenschicht kommt. Für diesen Fall muss eine Rezeptur gefunden werden, bei welcher die Kapselmatrix destabilisiert ist, sodass die Kapseln zerfallen.

4.4.3 Einfluss durch Destabilisierung der Kapselmatrix

Eine Destabilisierung der Matrix soll dazu führen, dass es bei Kontakt mit Wasser zu Erosion, Zerbrechen oder Auflösen der Partikeln kommt, damit auch Wirkstoffe aus dem Kapselkern herausgelöst werden können. Um dies zu erreichen, wurde der Anteil des Matrixmaterials verringert und mit hydrophileren Substanzen ersetzt. Zunächst wurde der Emulgatoranteil weiter erhöht, was jedoch zu einer starken Abnahme der Rieselfähigkeit des Pulvers führte und deshalb nicht weiterverfolgt wurde. Als bessere Methode stellte sich das Beimischen von Softenol 3995 (im Folgenden als MG abgekürzt) heraus. Das Mono-/ Diglycerid auf Rapsölbasis wurde zu einem Anteil von 20 % zur Kapselrezeptur hinzugefügt. Die übrige Kapsel setzte sich aus 35 % gehärteten Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616 zusammen. Die Auswirkung der Destabilisierung wird v.a. bei Durchführung einer Dispersionstitration gemäß der in Kapitel 3.2.4.2 beschriebenen Methode deutlich. Der Verlauf der Partikelgröße der beschriebenen Variante wird im Vergleich zu Kapseln ohne MG in Abbildung 33 veranschaulicht.

4.4 Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln

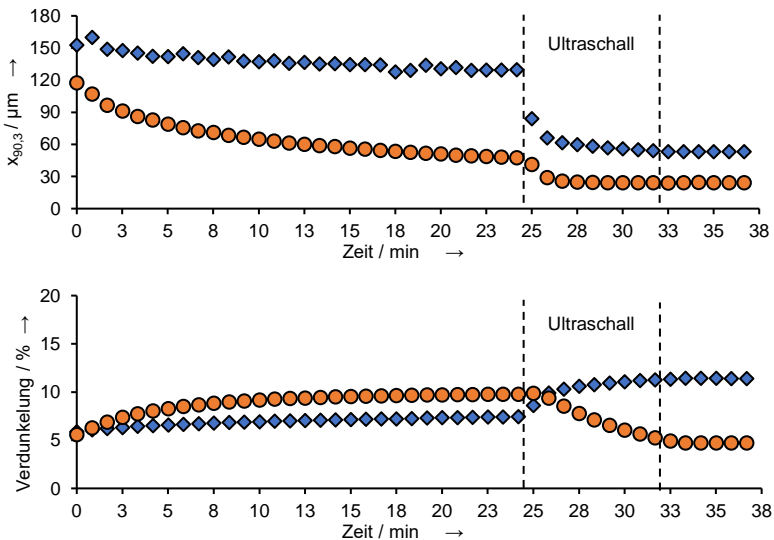


Abbildung 33: Verlauf des $x_{90,3}$ -Werts (oben) und der Verdunkelung (unten) für Pulver ohne Zusatz von Softenol 3995 \diamond und mit Softenol 3995 \circ . Das An- und Abschalten des Ultraschalls ist mit gestrichelten Linien markiert

Die Verläufe der $x_{90,3}$ -Werte sind bei beiden Pulvern sehr unterschiedlich. Bei der Variante ohne MG ist durch den Rühreintrag kaum eine Zerkleinerung von Agglomeraten zu erkennen. Die Partikelgröße fällt von anfangs 153 μm auf 130 μm ab. Im Vergleich dazu sinkt der $x_{90,3}$ -Wert bei Zusatz von MG von 117 μm auf 47 μm . Nach Applikation von Ultraschall ist bei beiden Varianten eine weitere Verkleinerung der Partikelgröße zu beobachten. Nach dem Abschalten des Ultraschalls bleiben die Werte konstant, was auf eine stabile Dispersion hinweist. Der aufgetragene Kennwert ist zum Ende der Messung bei der Variante mit MG mit einem Wert von 24 μm deutlich kleiner als beim Pulver ohne MG (53 μm). Die Verdunkelungsrate steigt bei beiden Pulvern an bis Ultraschall angelegt wird. Dann unterscheiden sich die Verläufe: Bei der Variante mit MG kommt es zu einem Abfall der Verdunkelung, während sie ohne MG schlagartig ansteigt.

Zur Deutung der Ergebnisse aus dem Laserbeuger muss der Verlauf der Partikelgröße mit der Verdunkelung verglichen werden. Sinkt die Partikelgröße bei steigender Verdunkelung, weist dies auf die Entstehung kleinerer Partikeln hin. Anhand der Daten kann nicht erkannt werden, ob dies aufgrund der Zerkleinerung von Agglomeraten oder durch Erosion bzw. das Zerbrechen der Partikeln geschieht. Die Partikelgröße nimmt bei der Variante mit MG so stark ab, dass der Wert vor Aktivierung des

Ultraschalls unter der Partikelgröße des Pulvers ohne MG nach Ultraschall liegt. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Kapseln mit MG tatsächlich bereits durch Rühreintrag zerkleinert werden. Bei Anlegen von Ultraschall zeigt sich ein anderer Effekt: Die Verdunkelungsrate nimmt trotz fallender Partikelgröße ab. Dieser Zusammenhang ist ein Zeichen dafür, dass sich die Kapseln teilweise im Wasser auflösen. Die Zugabe von MG führt also nicht nur zu Erosion oder Zerbrecen der Partikeln, sondern auch zum Lösen der Matrix. Eine Betrachtung im Lichtmikroskop bestätigte diese Vermutung (siehe Abbildung 34).

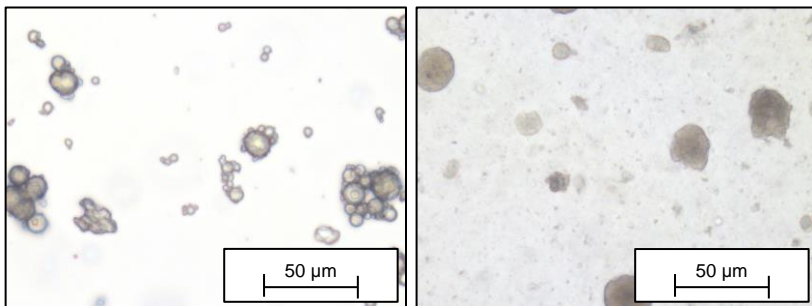


Abbildung 34: Aufnahmen von suspendierten Kapseln ohne (links) und mit Softenol 3995 (rechts) in 20-facher Vergrößerung im Lichtmikroskop nach 20-minütigem Rühren

In der Suspension des Pulvers ohne MG sind auch nach 20-minütigem Rühren noch immer Agglomerate zu erkennen, während die Partikeln mit MG vereinzelt vorliegen. Zusätzlich sind die Kapseln mit MG unförmig und es ist eine deutliche Trübung des Hintergrunds aufgrund von kleinen Bruchstücken zu erkennen. Bei genauerer Betrachtung der größeren Partikeln fällt auf, dass sie keine eindeutige Phasengrenzfläche mehr besitzen. Dies zeigt, dass sich die Kapseln im Auflösungsprozess befinden. Die beiden Versuche mit Laserbeuger und Lichtmikroskop beweisen, dass die Kapselmatrix durch die Zugabe von MG destabilisiert werden kann. Um zu untersuchen, welche Auswirkung dies auf die Wirkstofffreisetzung besitzt, wurde die Freisetzungskinetik analog zum Versuch aus Kapitel 4.4.2 bestimmt.

4.4 Charakterisierung des Freisetzungsmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln

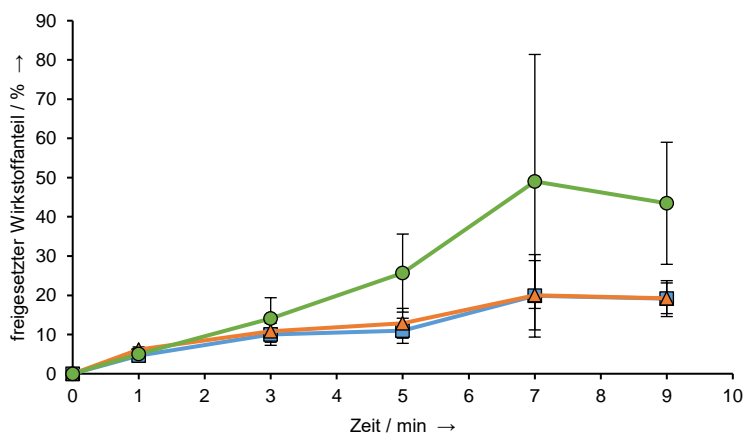


Abbildung 35: Verlauf der Freisetzung in auf 4 °C gekühltem Wasser einer Variante mit gehärtetem Rapsöl, Softenol 3995 und den Emulgatoren Brij S20 und C-1616. Lupulone —■—, Humulone —▲— und Xanthohumol —●—

Anders als beim Pulver ohne MG blieb der hohe anfängliche Freisetzungsschub aus. Der freigesetzte Wirkstoffanteil stieg, wie auch im Versuch ohne MG, bis zur siebten Minute an und blieb anschließend konstant.

Die Zugabe von MG hatte eine verringerte Freisetzungsrates zur Folge. Dies ist zunächst unerwartet, da durch die Zerkleinerung von Agglomeraten und das Zerschneiden bzw. Auflösen der Partikeln eine sehr große Grenzfläche mit kurzen Diffusionswegen entsteht. Außerdem besitzen Monoglyceride emulgatorähnliche Eigenschaften. Deshalb wurden zwar insgesamt mehr Lupulone und Humulone herausgelöst, aber nach Minute sieben kam die Freisetzung zum Erliegen – etwa zum gleichen Zeitpunkt wie bei Kapseln ohne MG.

Der Mechanismus bei einer sich auflösenden Matrix ist komplexer als zunächst angenommen. Ein möglicher Grund für die verlangsamte Freisetzung könnte sein, dass freie Emulgator-Moleküle sich bei der Bildung von Bruchstücken zunächst an der Grenzfläche anordnen. Eine größere Grenzfläche bedeutet, dass weniger Mizellen im Lösungsmittel vorliegen und die Wirkstoffe folglich verlangsamt aus der Kapsel herausgelöst werden. Weiterhin handelt es sich bei der Matrix – wie bei den Wirkstoffen – um ein schwer wasserlösliches Material. Ein Auflösen der gesamten Kapsel bedeutet, dass auch das Matrixmaterial in die Mizellen eingebaut wird. Dadurch steht das Lipid in Konkurrenz mit den Wirkstoffen, weshalb die Freisetzung gebremst wird.

Die Zugabe von Softenol 3995 führte zu einer Zerkleinerung der Partikeln, konnte aber die Freisetzung nur im Hinblick auf die Lupulone und Humulone geringfügig verbessern. Was die biologische Wirksamkeit betrifft, könnte eine geringe Partikelgröße dennoch einen Vorteil bringen, da dadurch eine homogene Schicht auf der Pflanze erreicht werden kann. Im Gegensatz dazu sollte ein Auflösen der Matrix vermieden werden, da sonst die Schutzfunktion der Kapsel verloren geht.

4.5 Zusatz von Dispergiermitteln

Bisher konnten durch den Zusatz von Emulgatoren Varianten entwickelt werden, welche die Anforderungen bezüglich Suspensionsstabilität und Wirkstofffreisetzung grundsätzlich erfüllen. In diesem Kapitel soll untersucht werden, ob die Rezeptur durch Verwendung zusätzlicher Adjuvanten weiter verbessert werden kann. Wie in Kapitel 4.4.3 gezeigt wurde, können Agglomerate von Kapseln, die sich nicht auflösen bzw. zerfallen, nur in geringem Ausmaß aufgebrochen werden. Größere Partikeln bzw. Agglomerate sinken schneller ab und setzen weniger Wirkstoff frei, weshalb eine Optimierung der Varianten durch eine verbesserte Vereinzelnung der Partikeln in Wasser möglich ist. Es wurden deshalb weitere Tenside, sogenannte Dispergiermittel, getestet. Sie sollen vor allem die Reagglomeration von dispergierten Partikeln verhindern. Die Hilfsmittel werden ins Wasser gemischt, damit sie sich auf der Partikeloberfläche anordnen können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung der Dispergiermittel auf die Suspensionsstabilität und die Vereinzelnung der Kapseln mithilfe des Laserbeugers untersucht.

Für die Versuche wurde erneut die Variante aus 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616 gewählt. Zur Bestimmung der Suspensionsstabilität wurden die in Kapitel 3.1.4 aufgeführten Dispergiermittel mit einem Anteil von 2 Vol.-% im Wasser gelöst. Die Ergebnisse der Versuche sind in Abbildung 36 aufgezeigt.

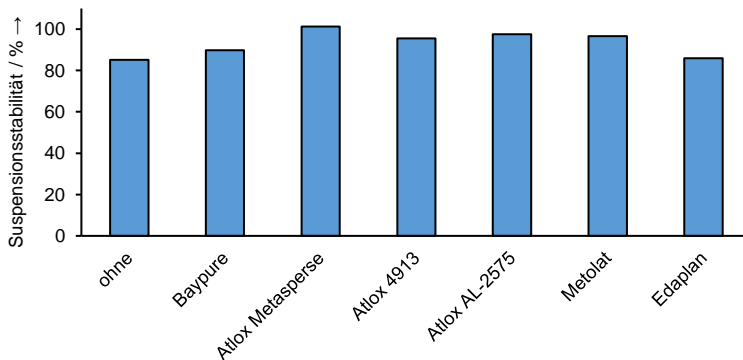


Abbildung 36: Suspensionsstabilität von Hopfenextrakt-Kapseln bei verschiedenen Dispergiermitteln mit einem Volumenanteil von 2 % im Wasser

Ohne zusätzliche Dispergiermittel beträgt die Suspensionsstabilität 85 %. Der höchste Wert wurde mit Atlox Metaspense mit ca. 100 % erreicht, die Partikeln wurden also perfekt in Schwebelage gehalten. Auch die anderen Zusatzstoffe zeigten eine Verbesserung der Suspensionsstabilität. Die einzige Ausnahme stellt Edaplan dar, bei dem kein Unterschied zur Vergleichsvariante festzustellen war. Ähnlich zu den Emulgatoren sind auch die genauen Zusammensetzungen der Dispergiermittel nicht bekannt. Generell handelt es sich um langkettige Tenside. Im Hinblick auf die Sinkgeschwindigkeit können sie zu einer erhöhten Viskosität und zu einer erhöhten Widerstandskraft führen und damit die Sedimentation der Partikeln verlangsamen. Der Versuch zeigte, dass die Dispergiermittel zur weiteren Optimierung der Suspensionsstabilität verwendet werden können.

Zusätzlich sollte untersucht werden, ob die Dispergiermittel auch die Vereinzelung der Agglomerate erleichtern können. Dazu wurden die Substanzen zu 2 Vol.-% ins Wasser des Laserbeugers gemischt und eine Dispersionstiteration durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Zur Veranschaulichung sind die Mittelwerte der letzten fünf $x_{90,3}$ -Werte vor der Aktivierung und Deaktivierung des Ultraschalls aufgeführt.

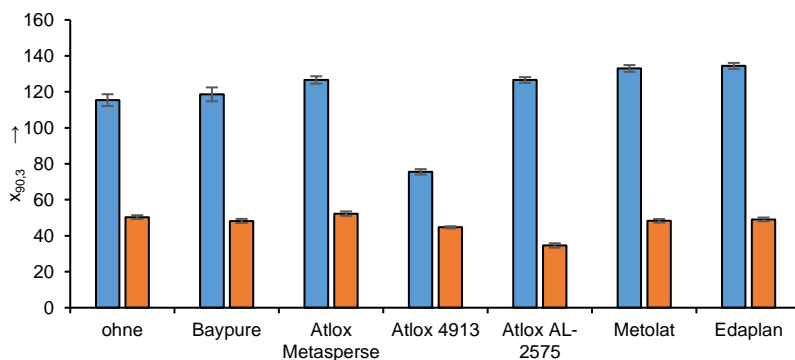


Abbildung 37: Einfluss der Zugabe von Dispergiermitteln auf den $x_{90,3}$ -Wert bei reinem Röhreintrag ■ und nach Ultraschall ■ im Laserbeuger

Der $x_{90,3}$ -Wert der Vergleichsvariante betrug nach Röhreintrag ca. 115 µm und nach der Aktivierung von Ultraschall ca. 50 µm. Bis auf Atlox 4913 sind die Werte ohne Ultraschall durch Zusatz von Dispergiermittel leicht erhöht. Nach Ultraschall stellten sich vergleichbare Werte aller Varianten ein. Die beste Zerkleinerung von Agglomeraten durch Röhreintrag konnte mit Atlox 4913 beobachtet werden. Bei dem Pulver wurde ein $x_{90,3}$ -Wert von 76 µm erreicht. Atlox AL-2575 führte zur geringsten Partikelgröße nach Ultraschall von 33 µm.

Die Zugabe von Dispergiermitteln ins Wasser der Nasszelle führte nur in einem Fall zu einer verbesserten Zerkleinerung von Agglomeraten durch Röhreintrag. Der deutlich verringerte $x_{90,3}$ -Wert nach Zugabe von Atlox 4913 zeigt, dass die Tensidmoleküle in die Zwischenräume von Agglomeraten eindringen und die Haftkräfte lösen konnten. Dass die Partikelgröße nach der Applikation von Ultraschall dennoch vergleichbar mit der Variante ohne Dispergiermittel ist, kann als Beleg dafür verwendet werden, dass weder Zerbrechen noch Auflösen der Partikeln vorliegen. Im Gegensatz dazu führte die Zugabe von Atlox AL-2575 nach Anlegen von Ultraschall zu einer auffällig geringen Partikelgröße. In dem Fall ist von einem Zerbrechen der Partikeln auszugehen.

Aus den beiden Versuchen geht hervor, dass Atlox 4913 sowohl die Suspension stabilisieren als auch die Vereinzelung der Partikeln verbessern kann. In den Untersuchungen wurde das Dispergiermittel ins Wasser gemischt, was für den Anwender zur Folge hätte, dass er die Spritzbrühe in zwei Schritten ansetzen müsste. Eine einfachere Lösung wäre, das Dispergiermittel ebenfalls in die Kapsel zu integrieren. In einem weiteren Versuch wurde Atlox 4913 zu einem Anteil von 5 % zur Kapselrezeptur hinzugefügt. Der Rest der Kapsel bestand aus 50 % gehärtetem Rapsöl, 15 %

Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616. Die Auswirkungen auf Suspensionsstabilität und Dispergierbarkeit sind im Vergleich zur Variante ohne bzw. externem Dispergiermittel in Abbildung 38 visualisiert.

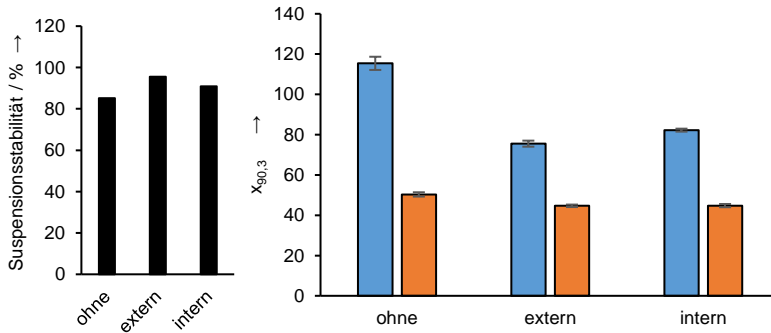


Abbildung 38: Suspensionsstabilität (links) und $x_{90,3}$ -Werte einer Variante ohne Dispergiermittel, verglichen mit externer und interner Zugabe von Atlox 4913. Partikelgröße nach Röhreintrag ■ und nach Ultraschall ■ im Laserbeuger

Die Suspensionsstabilität wurde sowohl durch externe als auch interne Zugabe von Atlox 4913 erhöht. Die Stabilität war bei Zugabe des Dispergiermittels direkt ins Wasser höher. Dies liegt vor allem daran, dass die Menge des verwendeten Dispergiermittels bei externer Zugabe mit ca. 5 g um den Faktor 120 höher war. Die Konzentration im Wasser wurde anhand von mehreren Versuchsreihen auf 2 Vol.-% festgelegt, da unterhalb dieser Konzentration kaum Unterschiede zur Vergleichsvariante zu erkennen waren. Dies lässt sich dadurch begründen, dass die Tensid-Moleküle bei externer Zugabe mit der Kapseloberfläche in Kontakt kommen müssen. Bei starker Verdünnung im Lösungsmittel wird ein Zusammentreffen unwahrscheinlicher. Bei Verkapselung des Dispergiermittels ist der Kontakt zwischen Kapseloberfläche und Tensid garantiert. Dementsprechend reicht bereits eine sehr geringe Konzentration aus, um einen Effekt zu erkennen.

Auch bei der Messung der $x_{90,3}$ -Werte bewirkte die externe Dispergiermittel-Zugabe die beste Vereinzelnung der Kapseln durch Röhreintrag. Bei internem Atlox 4913 ist die betrachtete Partikelgröße mit einem Wert von 82 μm deutlich kleiner als ohne Dispergiermittel (115 μm) und nur geringfügig größer als bei externem Einmischen (76 μm). Die Verschlechterung lässt sich ebenfalls auf die geringere Menge intern eingesetzten Dispergiermittels zurückführen. Allerdings kann die verringerte Vereinzelnung auch an der erhöhten Klebrigkeit, welche das Pulver mit verkapseltem Atlox 4913 aufweist, liegen. Nach dem Anlegen

von Ultraschall zeigen die Pulver vergleichbare $x_{90,3}$ -Werte, weshalb ein Auflösen bzw. Zerschneiden der Partikeln ausgeschlossen werden kann.

Die Verkapselung des Dispergiermittels hat sich als effizienter herausgestellt, da eine deutlich geringere Menge des Hilfsstoffs eingesetzt werden muss. Zudem zeigten Messungen der freigesetzten Wirkstoffmenge, dass die Zugabe von Atlox 4913 das Herauslösen von Xanthohumol verbessert (siehe Anhang, Abbildung 61). Mithilfe des Dispergiermittels konnte die Kapselrezeptur demnach in Bezug auf die Suspensionsstabilität, die Vereinzelung der Kapseln durch Röhreintrag und die Freisetzung von Xanthohumol verbessert werden.

4.6 Stabilitätsuntersuchungen

Hinsichtlich der Stabilität der Hopfenextrakt-Kapseln sollen verschiedene Aspekte betrachtet werden. Nicht nur die Wirkstoffe selbst, sondern auch alle weiteren Produkteigenschaften (Fließfähigkeit, Wirkstofffreisetzung etc.) müssen über einen längeren Zeitraum stabil sein. In diesem Kapitel wird zunächst der Abbau der Wirkstoffe behandelt. Im zweiten Teil werden die Veränderungen der Kapsel­eigenschaften während der Lagerung beschrieben.

4.6.1 Stabilität der Wirkstoffe

Wie sich bereits bei dem Test verschiedener Matrixmaterialien (Kapitel 4.1.2) herausstellte, unterliegen die Wirkstoffe bei der Produktion mittels Sprüherstarrung einem Abbau. Es müssen deshalb Maßnahmen getroffen werden, um den Wirkstoffverlust sowohl bei der Produktion als auch bei der Lagerung zu minimieren.

4.6.1.1 Untersuchung des Wirkstoffabbaus in Hopfenextrakt-Kapseln

Aus der Literatur ist bekannt, dass der Wirkstoffabbau primär durch Autoxidation verursacht wird [25]. Die Verkapselung soll zum Schutz der Wirkstoffe dienen, allerdings ist bei Matrixkapseln der Kontakt der Wirkstoffe mit der Umgebungsluft möglich. Zudem kann Licht in die Mikropartikeln eindringen und einen Wirkstoffverlust verursachen. Im ersten Schritt muss die Ursache des Wirkstoffabbaus in der Kapsel gefunden werden, um anschließend die passenden Maßnahmen ergreifen zu können.

Mithilfe der in Kapitel 3.2.5.2 beschriebenen Methode wurde untersucht, welche Auswirkungen Licht- und Lufteinwirkung auf die Wirkstoff-

stabilität in den Kapseln haben. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Getestet wurde eine Variante mit 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616. Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abbildung 39 aufgeführt. Alle Werte sind auf die gemessene Wirkstoffmenge in den Kapseln nach der Produktion bezogen.

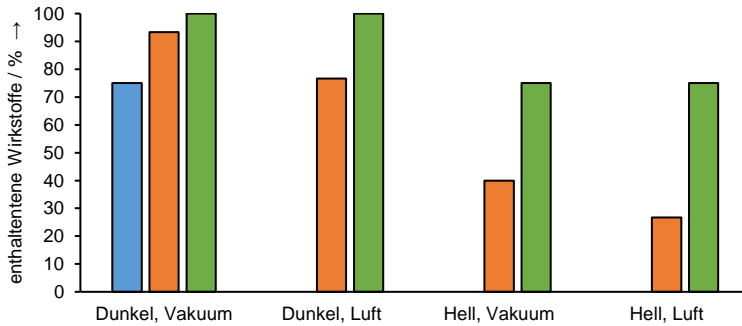


Abbildung 39: Verbliebene Wirkstoffe in Hopfenextrakt-Kapseln nach 24 h Lagerung und Raumtemperatur bei verschiedenen Bedingungen. Lupulone ■ , Humulone ■ und Xanthohumol ■

Bei allen Varianten war ein Abbau der Lupulone und Humulone zu erkennen. Die wenigsten Wirkstoffe gingen bei Lagerung im Dunkeln und im Vakuum verloren. Die größte Abnahme war unter Lichteinwirkung und Luftkontakt festzustellen. Auffällig ist, dass keine Lupulone mehr nachgewiesen werden konnten, falls die Kapseln in Kontakt mit Licht oder Luft gelagert wurden. Die Humulone wurden verstärkt im Hellen im Vakuum als im Dunkeln mit Luft abgebaut. Auch in diesem Versuch ist Xanthohumol die stabilste Wirkstoffkomponente und wurde nur bei Lichteinwirkung verringert.

Bei der Variante im Dunkeln und unter Vakuum wurde der Versuch unternommen, ideale Lagerbedingungen zu schaffen und damit den Abbau vollständig zu verhindern. Dennoch konnten die Lupulone und Humulone nicht komplett geschützt werden. Dies kann daran liegen, dass kein perfektes Vakuum vorlag oder enthaltene Feuchte im Pulver eine Oxidation hervorrief. Des Weiteren zeigt der Versuch, dass sowohl UV-Strahlung als auch Luftsauerstoff zu einem kompletten Abbau der Lupulone führt. Anhand der Humulone und Xanthohumol kann vermutet werden, dass die UV-Einwirkung bedeutender als der Kontakt mit Luft ist. Der Abbau dieser Substanzen erfolgte weniger durch Oxidation als durch Isomerisierung.

Mit dem Versuch konnte bestätigt werden, dass das Pulver zur bestmöglichen Lagerstabilität in einem lichtdichten, vakuumierten Behälter aufbewahrt werden muss. Sobald die Kapseln im Feld ausgebracht werden, sind sie sowohl Sauerstoff als auch Sonnenlicht ausgesetzt. Damit die Wirkstoffe nicht innerhalb kürzester Zeit abgebaut werden, ist die Verwendung von Antioxidantien oder UV-Schutzmitteln zwingend erforderlich.

4.6.1.2 Vergleich der Wirkung von UV-Schutzmitteln und Antioxidantien

Da Bestrahlung mit UV-Licht zum stärksten Wirkstoffabbau führte, wurde die Auswirkung von UV-Schutzmittel und von Stoffen mit antioxidativer Wirkung bei 24-stündiger Beleuchtung untersucht. Getestet wurden zwei Lichtschutzmittel mit den Bezeichnungen Tinosorb S und Uvinul MC 80. Die UV-Protektoren wurden zu einem Anteil von 8 % in die Kapsel gemischt. In der Forschung von M. Pemsel [65] erzielte v.a. die Kombination der beiden Substanzen sehr gute Ergebnisse zum Schutz eines verkapselten Granulosevirus, weshalb ebenfalls eine Variante mit je 4 % Uvinul MC 80 und Tinosorb S untersucht wurde. Die übrigen Bestandteile der Kapseln mit UV-Schutz waren 47 % gehärtetes Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616. Daneben wurden Kapselvarianten mit den fettlöslichen Antioxidantien Carotin, BHT und Tocopherol hergestellt. Diese wurden zu einem Anteil von 4 % in die Rezeptur eingefügt. Alle Pulver wurden unter Luftkontakt 24 h lang mit UV-Licht bestrahlt und im Anschluss ausgewertet. Die Resultate für den verbleibenden Wirkstoffanteil in den Kapseln sind in Abbildung 40 aufgeführt. Alle Werte sind auf die gemessene Wirkstoffmenge in den Kapseln nach der Produktion bezogen.

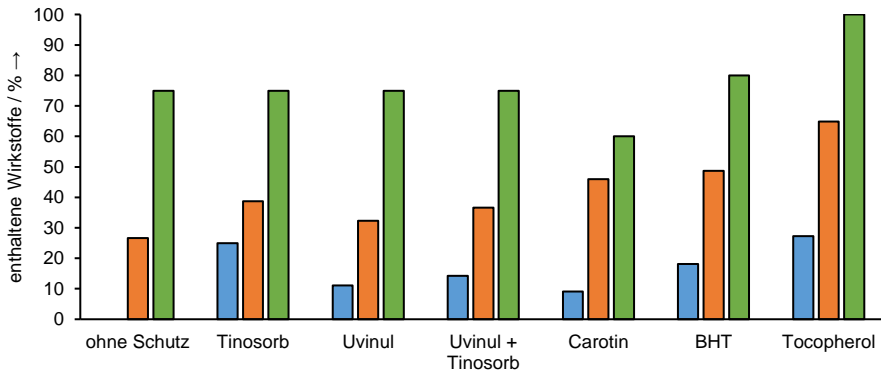


Abbildung 40: Verbliebene Wirkstoffe in Hopfenextrakt-Kapseln mit integrierten UV-Schutzmitteln und Antioxidantien nach 24 h Bestrahlung mit UV-Licht. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Im Gegensatz zur Vergleichsvariante ohne Schutz konnten Lupulone bei Kapseln mit integrierten Protektoren wiedergefunden werden. Die höchste Menge unter den Pulvern mit UV-Schutzmitteln (25 %) wurde mit Tinosorb erzielt. Mit Uvinul konnten nur 11 % der Lupulone geschützt werden und das Ergebnis der Kombination liegt mit 14 % zwischen den beiden Einzelstoffen. Die gleichen Tendenzen lassen sich bei Betrachtung der Humulone erkennen – wenn auch weniger deutlich. Die Stabilität von Xanthohumol betrug bei allen Varianten mit Lichtschutz 75 %. Bei den Antioxidantien konnte die höchste Wirkstoffstabilität mit Tocopherol nachgewiesen werden. Bei der Variante konnten nach 24 h Bestrahlung noch 27 % Lupulone, 65 % Humulone und 100 % Xanthohumol wiedergefunden werden. Unter den Antioxidantien zeigte Carotin die schlechteste Wirkung. Generell waren die Humulone stabiler bei Zusatz von Antioxidantien als bei den UV-Schutzmitteln.

Der Effekt der UV-Schutzmittel war v.a. bei den Lupulonen zu erkennen. Durch die Absorption der Lichtenergie konnte die Bildung von Radikalen und dadurch auch der Abbau des empfindlichen Wirkstoffes gehemmt werden. Tinosorb funktionierte dabei besser als Uvinul. Dafür gibt es mehrere mögliche Gründe. Zum einen besitzt Tinosorb das breitere Absorptionsspektrum und die höhere Fettlöslichkeit, die für eine homogenere Verteilung in der Kapsel sorgt. Zum anderen wird über Cinnamate, zu denen Uvinul gehört, berichtet, dass sie eine leichte Instabilität gegen UVA- und UVB-Strahlung besitzen [94]. Deshalb ist es besser, Tinosorb S als einziges UV-Schutzmittel einzusetzen. Selbst dann konnten jedoch lediglich 25 % der Lupulone und 12 % der Humulone mehr

gegenüber der Vergleichsvariante geschützt werden. Ein Nachteil der UV-Filter ist außerdem, dass sie die absorbierte Lichtenergie in Wärme umwandeln können, was die Oxidation wiederum beschleunigt. Obwohl im Vorversuch aus Kapitel 4.6.1.1 die Lichteinwirkung als größter Faktor zum Wirkstoffabbau definiert wurde, konnte das beste Ergebnis mit dem Antioxidans Tocopherol erzielt werden. Dies zeigt, dass das Hemmen der Bildung von Radikalen mit UV-Filtern weniger effizient als der Einsatz von Radikalfängern ist. Hinzu kommt, dass Antioxidantien bereits während der Kapselproduktion ihren Zweck erfüllen und in den Pulvern generell mehr Wirkstoff enthalten ist. Zum Ende des Versuchs betrug der Anteil der Humulone in der Kapsel bei der Variante mit Tocopherol noch 2,4 %. Bei Tinosorb waren es lediglich 1,2 %.

Die unterschiedliche Schutzwirkung der Antioxidantien kann mehrere Ursachen haben. Normalerweise verhält sich die antioxidative Aktivität umgekehrt proportional zur Geschwindigkeitskonstante der Reaktion mit Peroxyradikalen. In dem Fall müsste jedoch BHT eine deutlich bessere Wirkung erzielen als Tocopherol. [64, S. 219] In der Kapsel müssen folglich noch weitere Faktoren existieren, die die Wirkstoffstabilität beeinflussen. Zum Beispiel wird BHT als Feststoff, Tocopherol als Flüssigkeit in die Schmelze eingerührt. Löst sich das BHT-Pulver nicht komplett im Fett, kommt es zu einer inhomogenen Verteilung und es liegen ungeschützte Bereiche in der Kapsel vor. Eine weitere Einflussgröße ist die Konzentration des Antioxidans. Bei sehr hohen Mengen kann sich die Wirkung umkehren und die Oxidation beschleunigen [64, S. 223]. Es muss deshalb die optimale Konzentration der Antioxidantien bestimmt werden.

Zusammenfassend konnte anhand der Versuche festgestellt werden, dass der Zusatz von Antioxidantien einen besseren Schutz der Wirkstoffe ermöglicht als UV-Schutzmittel. Dennoch wurde der Abbau nur verringert, nicht verhindert. Dieses Problem soll durch die Untersuchung weiterer Antioxidantien bzw. deren Kombination und durch die Optimierung der Konzentration gelöst werden.

4.6.1.3 Optimierung der Wirkstoffstabilität

Zur weiteren Verbesserung der Stabilität der Wirkstoffe während der Produktion und Lagerung wurden sechs verschiedene Antioxidantien (vgl. Kapitel 3.1.5) getestet. Dazu wurden Hopfenextrakt-Kapseln mit unterschiedlichen Mengen und Kombinationen der Additive produziert. Ascorbinsäure stand als grobkörniger Feststoff zur Verfügung, der nur sehr schlecht fettlöslich ist. Deshalb wurde das Antioxidans im Vorfeld auf eine Partikelgröße von ca. 2,5 µm mikronisiert. Da dies ein sehr aufwändiger

zusätzlicher Verfahrensschritt ist, wurde außerdem die Löslichkeit von Ascorbinsäure in der Schmelze der Rezeptur bestimmt. Bis zu einem Anteil von 0,2 % der Kapselmasse war die Produktion ohne Komplikationen möglich. Die Kapselrezeptur setzte sich bei allen Varianten aus gehärtetem Rapsöl als Matrix, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20, 15 % C-1616 und 0,2 % bis 1 % Antioxidans zusammen. Der Anteil des Matrixmaterials betrug demnach zwischen 54,8 % und 54 %. Die Versuche wurden gemäß der in Kapitel 3.2.5.3 beschriebenen Methode in einem luftdurchlässigen Gefäß im Inkubator bei 20 °C durchgeführt. Der nach sechs Tagen verbliebene Wirkstoffanteil in den Kapseln ist in Abbildung 41 für einzelne Antioxidantien dargestellt. Die Werte sind auf den Wirkstoffanteil in der Rezeptur bezogen.

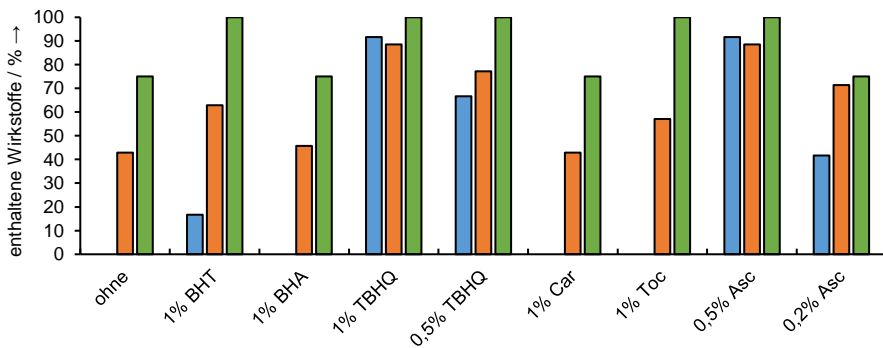


Abbildung 41: Enthaltene Wirkstoffe Antioxidans-haltiger Hopfenextrakt-Kapseln nach sechstägiger Lagerung bei 20 °C an der Luft. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Ohne Schutz vor Oxidation waren bei den Lagerungsbedingungen keine Lupulone mehr in der Kapsel enthalten. Der Anteil der verbliebenen Humulone betrug 43 %, von Xanthohumol 75 %. Bei Zugabe von BHA und Carotin war keine Verbesserung der Stabilität zu erkennen. BHT und Tocopherol führten zu einem leicht erhöhten Anteil von Humulonen und Xanthohumol. Bei BHT konnten zusätzlich noch 17 % der Lupulone nachgewiesen werden. Die mit Abstand besten Ergebnisse lieferten 1 % TBHQ und 0,5 % Ascorbinsäure. Bei beiden Varianten waren noch 92 % der Lupulone, 89 % der Humulone und das komplette Xanthohumol enthalten. Eine Verringerung der Antioxidantien (nur teilweise abgebildet) führte bei allen Varianten zu einer geringeren Wirkstoffstabilität.

Die beiden Antioxidantien TBHQ und Ascorbinsäure besitzen eine auffallend hohe protektive Wirkung in den Hopfenextrakt-Kapseln. Sie unterscheiden sich von den anderen Protektoren durch ihre erhöhte

Polarität. Bei Emulsionen konnte beobachtet werden, dass sie sich deshalb bevorzugt an der Oberfläche der Fettphase anreichern. Sie bilden dadurch eine schützende Schicht, die das Eindringen von Radikalen verhindert. [64, S. 221] Die Versuche zeigen, dass dieses Prinzip auch auf die Lipidmikropartikeln übertragen werden kann. Beim Sprühvorgang müssen sich die hydrophilen Antioxidantien zusammen mit dem hydrophilen Teil der Emulgatoren auf der Kapseloberfläche anreichern. Ein Vergleich der Varianten mit 0,5 % TBHQ und der mit 0,5 % Ascorbinsäure zeigt außerdem, dass Ascorbinsäure die höchste antioxidative Wirkung in der Kapsel besitzt. Eine Verringerung der Menge der Antioxidantien verschlechterte das Ergebnis, denn auch sie unterliegen sauerstoff-induziertem Abbau und können nur zeitlich begrenzten Schutz bieten. Die lipophilen Antioxidantien konnten einen Abbau der Wirkstoffe nur in sehr geringem Maß verhindern. Da sie sehr gut fettlöslich sind, werden sie homogen in der Kapsel verteilt. Dadurch können die Wirkstoffe dennoch in Kontakt mit Radikalen kommen und oxidiert werden. Es ist denkbar, dass bei BHA und Carotin eine zu niedrige Menge eingesetzt wurde und deshalb nach sechs Tagen kein Effekt mehr erkennbar war.

Ascorbinsäure hat sich zur Anwendung in den Hopfenextrakt-Mikrokapseln als besonders wirksam herausgestellt. Allerdings ist aufgrund der geringen Löslichkeit nur eine Einsatzmenge von 0,2 % der Kapselmasse ohne weitere Verfahrensschritte möglich. In dem Fall verschlechterte sich der Oxidationsschutz jedoch deutlich. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher untersucht, ob die Kombination von Ascorbinsäure mit anderen Antioxidantien den Verlust der Wirksamkeit kompensieren kann. Die Ergebnisse der Kombinationen mit Tocopherol und TBHQ sind in Abbildung 42 zusammengefasst.

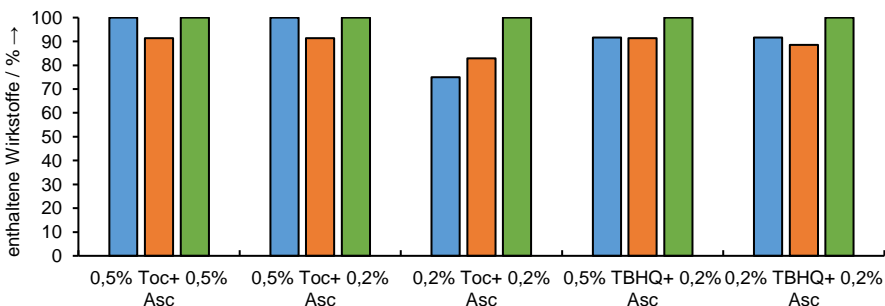


Abbildung 42: Enthaltene Wirkstoffe von Hopfenextrakt-Kapseln mit einer Kombination von Antioxidantien nach sechstägiger Lagerung bei 20 °C an der Luft. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumul ■

Bei Kombination von 0,5 % Tocopherol und 0,5 % bzw. 0,2 % Ascorbinsäure wurden die gleichen Wirkstoffmengen gemessen. In den beiden Varianten konnte nahezu der komplette Wirkstoff erhalten werden. Einzig der Anteil der Humulone sank auf 91 %. Die Verringerung des Tocopherol-Anteils auf 0,2 % war mit einer Abnahme der Lupulon- und Humulon-Stabilität verbunden. Auch mit der Kombination aus TBHQ und Ascorbinsäure konnte eine hohe antioxidative Wirkung erreicht werden. Von den Lupulonen waren noch 92 % stabil, von den Humulonen waren es noch ca. 90 %. Über die Versuchsdauer konnte bei keiner der Varianten ein Abbau von Xanthohumol festgestellt werden.

Die antioxidative Wirkung aus der Kombination von Tocopherol und Ascorbinsäure war bei den Versuchsbedingungen groß genug, um die Oxidation der Wirkstoffe komplett zu verhindern. Nur bei den Humulonen war ein Verlust von 9 % zu verzeichnen. Da die Oxidations-empfindlicheren Lupulone noch zu 100 % enthalten waren, muss die Abnahme auf eine Isomerisierung der α -Säuren zurückzuführen sein. Während der sechs Tage genügte 0,2 % der Ascorbinsäure, aber eine Verringerung des Tocopherolanteils auf ebenfalls 0,2 % verschlechterte die Stabilität. Dies zeigt, dass auch Tocopherol in der Kombination eine wichtige Funktion einnimmt. Aus der Literatur ist bekannt, dass die beiden Antioxidantien eine synergistische Wirkung besitzen. Tocopherol zeichnet sich durch eine sehr hohe Reaktionsgeschwindigkeit aus. Da Ascorbinsäure mit 0,06 V ein geringeres Redoxpotenzial als Tocopherol (0,2 V) besitzt, kann sie oxidiertes Tocopherol wieder reduzieren. [95, S. 592 f.] In der Kapsel ist die Anwesenheit von Tocopherol von Vorteil, weil eingedrungene Radikale schnell mit dem Antioxidans reagieren können, bevor es zur Oxidation der Wirkstoffe kommt. Ein sehr ähnliches Ergebnis lieferte die Kombination von TBHQ und Ascorbinsäure, was einen ähnlichen Mechanismus vermuten lässt.

Die antioxidative Wirkung der Ascorbinsäure konnte sowohl in Kombination mit Tocopherol als auch mit TBHQ verbessert werden. Beide Antioxidantien sind als Partner denkbar. Weil es sich bei TBHQ jedoch um eine synthetische Substanz handelt, sollte Tocopherol im biologischen Pflanzenschutz eingesetzt werden. Die Kombination aus 0,5 % Tocopherol und 0,2 % Ascorbinsäure genügte bei der verwendeten Methode, um die Wirkstoffe mindestens sechs Tage lang zu stabilisieren, Pflanzenschutzmittel müssen jedoch weitaus längere Lagerzeiten überstehen können. Aus diesem Grund wurden weitere Untersuchungen zur Langzeitstabilität der Wirkstoffe durchgeführt.

4.6.1.4 Stabilität der Wirkstoffe bei erhöhter Temperatur

Die Lagerung der Pulver bei erhöhter Temperatur ist eine Möglichkeit, die Langzeitstabilität der Wirkstoffe in den Kapseln zu beurteilen. Gemäß der in Kapitel 3.2.5.4 beschriebenen Methode erfolgte dies im Rahmen dieser Forschungsarbeit bei 54 °C über einen Zeitraum von 14 Tagen in einem luftdichten Braunglasfläschchen. Betrachtet wurden zwei verschiedene Zusammensetzungen der Kapseln. Eine Variante bestand aus 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1816. Zum Vergleich wurde der Rezeptur 0,5 % Tocopherol und 0,2 % Ascorbinsäure hinzugefügt. Die nach der Versuchsdauer enthaltenen Wirkstoffanteile sind in Abbildung 43 aufgeführt. Die Angaben beziehen sich auf den Anfangswert vor Beginn der Lagerung.

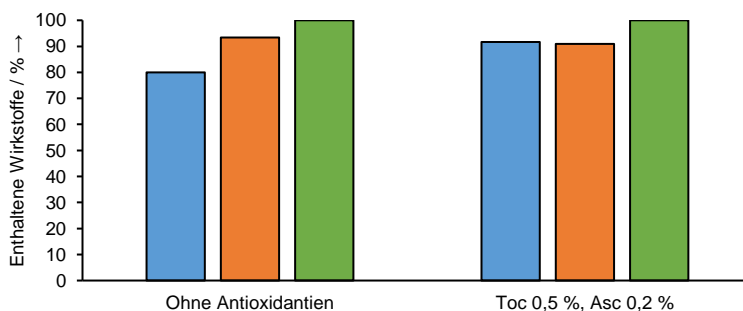


Abbildung 43: Enthaltene Wirkstoffe von Hopfenextrakt-Kapseln ohne bzw. mit Antioxidantien nach Lagerung bei 54 °C über 14 Tage. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■

Bei der Variante ohne Antioxidantien waren nach 14 Tagen noch 80 % der Lupulone, 93 % der Humulone und 100 % Xanthohumol enthalten. Durch Zugabe von Tocopherol und Ascorbinsäure konnten noch 92 % Lupulone, 90 % Humulone und ebenfalls 100 % Xanthohumol nachgewiesen werden.

Ohne Antioxidantien ist der Verlust an Lupulonen am höchsten, weil sie die instabilsten Substanzen darstellen. Durch Zusatz von Antioxidantien veränderten sich die Abbauraten. Tocopherol und Ascorbinsäure konnten die β -Säuren besser vor Oxidation schützen. Bei den Humulonen war dennoch keine Verbesserung festzustellen. Da die α -Säuren stabiler gegen Oxidation sind, muss die Abnahme durch Isomerisierung zustande kommen, die nicht durch Antioxidantien beeinflusst wird. Die Pulver wurden in Braunglasfläschchen gelagert, um das Eindringen von Licht zu verhindern. Es kann deshalb gefolgert werden, dass die Reaktion zu Iso- α -Säuren aufgrund der erhöhten Temperatur von 54 °C erfolgte.

Xanthohumol hingegen war sowohl gegen Oxidation als auch Isomerisierung stabil. Gemäß der Richtlinie von CIPAC sollten nach der Lagerung noch 95 % der Wirkstoffe (bezogen auf den Startwert vor der Lagerung) enthalten sein. Mit Antioxidantien wurde das Ziel nur knapp verfehlt. Aufgrund der Isomerisierung könnte eine Verringerung der Temperatur bei verlängerter Lagerungszeit zum Erfüllen der Vorgaben führen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies jedoch nicht untersucht.

Die Versuche zur Stabilität verdeutlichen, dass ein Verlust der verkapselten Hopfenwirkstoffe durch Oxidation und Isomerisierung zustande kommt. Die Oxidation kann durch die Integration von Tocopherol und Ascorbinsäure weitgehend unterbunden werden. Isomerisierung hingegen kann selbst bei Lichtausschluss unter erhöhten Temperaturen stattfinden. Zur bestmöglichen Lagerstabilität sollten die Pulver deshalb kühl, luftdicht und im Dunkeln gelagert werden.

4.6.2 Veränderung der Kapseleigenschaften durch Lagerung

Für ein stabiles Produkt muss nicht nur die enthaltene Wirkstoffmenge konstant bleiben. Auch die Produkteigenschaften sollten sich während der Lagerungsdauer nicht verändern. Relevante Charakteristiken sind die Rieselfähigkeit des Pulvers, die Dispergierbarkeit, die Suspensionsstabilität und die Wirkstofffreisetzung. Da es sich bei Lipidpartikeln um kristalline Strukturen handelt, können zeitliche Veränderungen auftreten, welche die genannten Eigenschaften beeinflussen. Die Auswirkungen möglicher struktureller Veränderungen wurden anhand einer Kapselvariante mit Emulgatoren untersucht. Als Grundlage für die Versuche dienten Kapseln aus 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616.

4.6.2.1 Strukturanalyse mittels dynamischer Differenzkalorimetrie

Die Kapselrezeptur besteht aus verschiedenen Materialien mit Schmelzpunkten im Messbereich zwischen -10 °C und 120 °C. Dazu gehören die beiden Emulgatoren Brij S20 und C-1616, sowie das Matrixmaterial (gehärtetes Rapsöl) selbst. Um die Peaks aus der DSC-Messung der Kapseln später den einzelnen Komponenten zuordnen zu können, wurden zunächst alle Stoffe separat analysiert. Das Messprogramm bestand – gemäß der in Kapitel 3.2.6 beschriebenen Methode – aus einer Aufheiz-, Abkühl- und einer zweiten Aufheizphase.

Der Verlauf des Wärmestroms während der ersten Aufheizphase ist in Abbildung 44 aufgetragen.

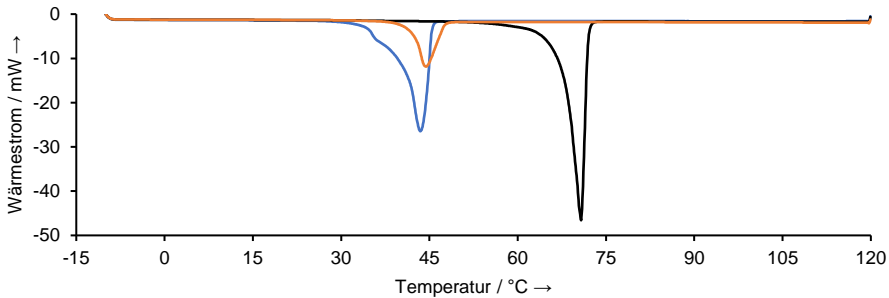


Abbildung 44: Verlauf der ersten Aufheizphase während der DSC-Analyse der einzelnen Kapselkomponenten: Gehärtetes Rapsöl (schwarz), Brij S20 (blau) und C-1616 (orange)

Die untersuchten Stoffe zeigen während der ersten Aufheizphase je einen Peak. Den niedrigsten Schmelzpunkt besitzt Brij S20 mit 43 °C, gefolgt von C-1616 mit 44 °C und gehärtetem Rapsöl mit 69 °C. Bei allen Komponenten war je ein Kristallisationspeak während des Abkühlens zu erkennen (nicht dargestellt). Dieser lag mit 25 °C bei Brij S20, 32 °C (C-1616) und 50 °C (gehardtetes Rapsöl) deutlich unterhalb der jeweiligen Schmelzpunkte. Dies war zu erwarten, da Kristallisation generell erst nach dem Unterschreiten des Schmelzpunktes stattfinden kann [96, S. 32]. Bei den beiden Emulgatoren verlief die zweite Aufheizphase identisch zur ersten. Es bildeten sich demnach dieselben Kristallstrukturen wie in der Ausgangssituation. Bei gehärtetem Rapsöl hingegen waren deutliche Unterschiede zu erkennen. Das zweite Aufheizen des Matrixmaterials ist in Abbildung 45 dargestellt.

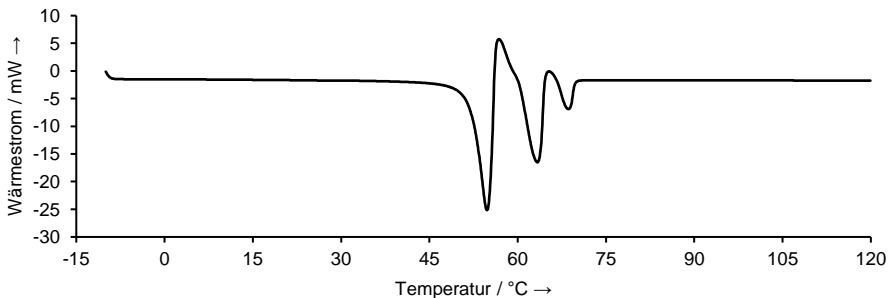


Abbildung 45: Verlauf der zweiten Aufheizphase während der DSC-Analyse von gehärtetem Rapsöl

Die Höhe des ursprünglichen Schmelzpeaks bei 69 °C war deutlich geringer. Daneben traten zwei neue Peaks bei 54 °C und 63 °C auf. Sie können den thermodynamisch instabileren Kristallstrukturen des Triglycerids zugeordnet werden. Im Verlauf der Abkühlung kristallisierte das Lipid in der kinetisch begünstigten α -Form aus. Während der zweiten Aufheizphase lag das Fett zum größten Teil in dieser instabileren Form vor, weshalb der Peak bei der niedrigsten Temperatur die größte Amplitude besitzt. Der Schmelzpunkt bei 63 °C kann demnach der Übergangsform β' zugeteilt werden. Der Peak bei 69 °C entspricht der stabilen β -Form, wie sie zu Beginn vorlag. Das Auftreten der drei Peaks bedeutet nicht automatisch, dass im Lipid tatsächlich alle drei Formen vorhanden sind. Nach dem Schmelzen der α -Struktur ist ein exothermer Peak zu erkennen, der für einen Kristallisationsvorgang spricht. Ein Teil des Fetts ordnete sich während des Erwärmens in einer monotropen fest-fest-Umwandlung über die Flüssigphase zur β' -Form um. Auch vor dem Schmelzpeak der β -Form ist dies anhand der Auslenkung in den positiven Ordinatenbereich festzustellen. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, dass das gehärtete Rapsöl während der zweiten Aufheizphase vollständig in der α -Form vorlag. Eine erneute Analyse desselben Tiegels nach 30 Tagen zeigte, dass sich die Peakfläche der α -Struktur verringerte und die der β -Form mit der Zeit vergrößerte (siehe Abbildung 62 im Anhang). Dies belegt, dass eine Umwandlung der Lipidstruktur bei den Lagerbedingungen (20 °C) stattfand.

Das Ziel der DSC-Messungen ist die Aufklärung, ob auch die Hopfenextrakt-Mikrokapseln einer strukturellen Wandlung unterliegen und – falls zutreffend – welche Auswirkungen auf die Produkteigenschaften festzustellen sind. In einer Versuchsreihe wurden Kapseln unmittelbar nach ihrer Produktion und während der Lagerung im Inkubator bei 20 °C vermessen. In Abbildung 46 sind die Verläufe der ersten Aufheizphase am Produktionstag (Tag 0) und an den Tagen 1, 14 und 96 zusammengefasst.

4 Ergebnisse und Diskussion

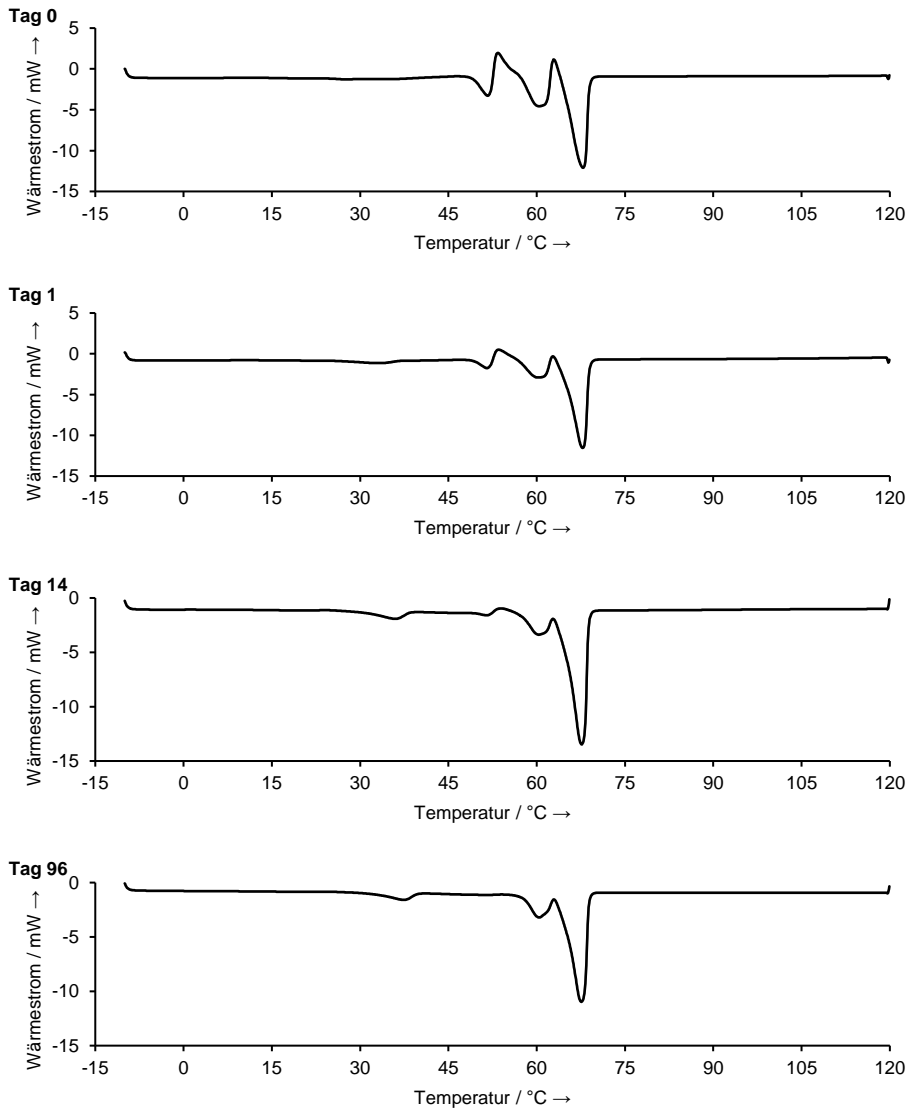


Abbildung 46: Verlauf der ersten Aufheizphase an verschiedenen Tagen nach der Produktion von Hopfenextrakt-Kapseln

Bei der Analyse an Tag 0 waren Peaks bei den Temperaturen 52°C, 60 °C und 67 °C zu erkennen. Anders als bei gehärtetem Rapsöl war die Amplitude des ersten Peaks am geringsten und die des letzten Peaks am größten. Weiterhin war die Grundlinie im Bereich zwischen 23 °C und 41 °C

geringfügig nach unten gewölbt. Im Verlauf der Lagerung waren mehrere Veränderungen zu erkennen. Zum einen verschwand der Peak bei 52 °C nach und nach, wobei der Peak bei 67 °C größer wurde. Zum anderen entstand ein weiterer Peak in dem Bereich, in dem an Tag 0 eine Wölbung der Grundlinie sichtbar war. Das Maximum des Peaks wanderte im Lauf der Zeit von 33 °C an Tag 1 bis 37 °C an Tag 96.

Die drei aufeinanderfolgenden Peaks an Tag 0 weisen eine große Ähnlichkeit zu der zweiten Aufheizphase des gehärteten Rapsöls auf. Die Lage lässt vermuten, dass auch in der Kapsel die fürs Matrixmaterial charakteristischen α -, β' - und β -Strukturen vorhanden sind. Die jeweiligen Peaks sind jedoch in der Kapsel zu leicht niedrigeren Temperaturen verschoben und bereits zum Zeitpunkt der ersten Messung ist nur noch ein geringer Anteil der α -Struktur vorhanden. Zurückführen lässt sich dies auf die integrierten Emulgatoren, deren Schmelzpeaks nicht zu erkennen sind. Dies ist ein Beleg dafür, dass sie in das Kristallgitter des gehärteten Rapsöls eingebaut wurden. Die Verringerung der Schmelzpunkte zeigt, dass die Tenside das Lipid thermodynamisch destabilisieren. Obwohl an Tag 0 alle Stoffe homogen im Lipid integriert waren, bildete sich im weiteren Verlauf ein zusätzlicher Peak bei niedrigeren Temperaturen aus. Dieser ist geringer als die Schmelzpunkte der Einzelstoffe, weshalb er keiner Kapselkomponente zugewiesen werden kann. Es muss sich deshalb um eine neue Konfiguration handeln, die bei der Umwandlung der α -Form aus dem Gitter des Lipids entsteht. Möglicherweise bilden sich dabei separate Mischkristalle aus Brij S20 und C-1616, die thermodynamisch instabiler als die Reinstoffe sind. Weitere Versuche, bei denen DSC-Messungen von getrockneten Kapselsuspensionen durchgeführt wurden, verdeutlichten zudem, dass die Emulgatoren aufgrund ihrer Hydrophilie Wasser binden können (siehe Abbildung 63 im Anhang). Die Einlagerung von Wasser verringerte den Schmelzpunkt der Tenside und verbreiterte den Peak. Die Beobachtung, dass der Schmelzpunkt der Struktur mit der Zeit ansteigt, kann ebenfalls durch vorliegende Feuchte erklärt werden: Während der Lagerung verdunstet das eingelagerte Wasser.

Weiter ist bei der DSC-Messung zu beobachten, dass die Emulgatoren die Umwandlung zur thermodynamisch stabilsten Form beschleunigen. Dies ist daran erkenntlich, dass die α -Struktur bereits nach 14 Tagen kaum noch nachzuweisen war, wohingegen bei reinem Fett noch nach 30 Tagen ein großer Anteil zu finden war. Es wäre zu erwarten, dass das rapide Abkühlen der Schmelze während der Produktion auch bei den Hopfenextrakt-

Kapseln zur Bildung der α -Struktur führt. Zum Zeitpunkt der DSC-Messung war jedoch nur noch ein kleiner Anteil zu erkennen. Um den Zustand der Kapseln unmittelbar nach der Produktion zu bestimmen, wurden mehrere Messungen in möglichst kurzen Zeitabständen durchgeführt. Trägt man die Peakfläche (normiert auf die Masse der Probe) gegen den Zeitpunkt der Messung auf, kann nachvollzogen werden, wie hoch der Anteil der α -Struktur nach dem Erstarren war. Die Auftragung ist in Abbildung 47 dargestellt.

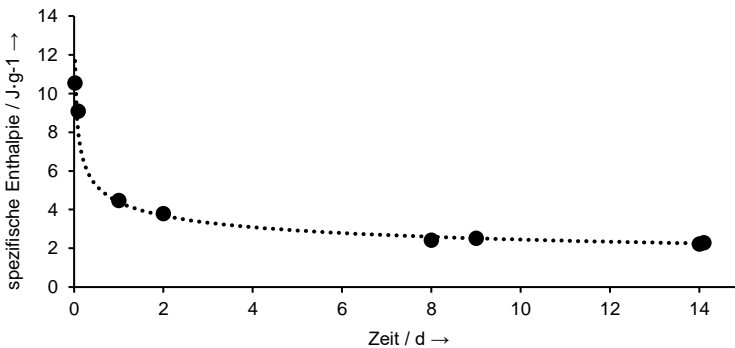


Abbildung 47: Verlauf der Peakfläche der α -Struktur von Hopfenextrakt-Kapseln

Der Verlauf der spezifischen Enthalpie des Peaks zeigt einen sehr steilen Abfall innerhalb der ersten Stunden nach der Produktion. Extrapoliert man den Verlauf bis zum Zeitpunkt der Erstarrung, erhält man eine spezifische Enthalpie von $78 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$. Dies entspricht in etwa der Summe aller Peakflächen aus der ersten Messung 30 Minuten nach der Produktion, die bei $81 \text{ J}\cdot\text{g}^{-1}$ lag. Unter der Berücksichtigung, dass die aufzubringende Schmelzenthalpie der β -Form geringfügig höher ist als die der α -Form ist die Abweichung vernachlässigbar. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass die Lipidkapseln in ihrer α -Form erstarren. Aufgrund der integrierten Emulgatoren kommt es zu einer Umkristallisation eines Großteils des Lipids innerhalb von wenigen Stunden. Die weitere Umwandlung der α -Struktur verläuft jedoch sehr langsam.

4.6.2.2 Rieselfähigkeit der Pulver

Die Veränderungen der Fließigenschaften der Hopfenextrakt-Kapseln wurde während der Lagerung der Pulver in zwei verschiedenen Behältern bei 20°C beobachtet. Ein Teil wurde in luftdurchlässigen HDPE-Weithalsflaschen aufbewahrt, der Rest wurde in luftdichte Braunglasflaschen überführt. Zur Beurteilung der Rieselfähigkeit wurden Bilder

angefertigt und die Bildung von Agglomeraten beobachtet. Vor dem Öffnen der Behälter wurde das Pulver aufgeschüttelt. In Abbildung 48 sind die Aufnahmen beider Behälter bis zu 43 Tage nach Herstellung zusammengestellt.

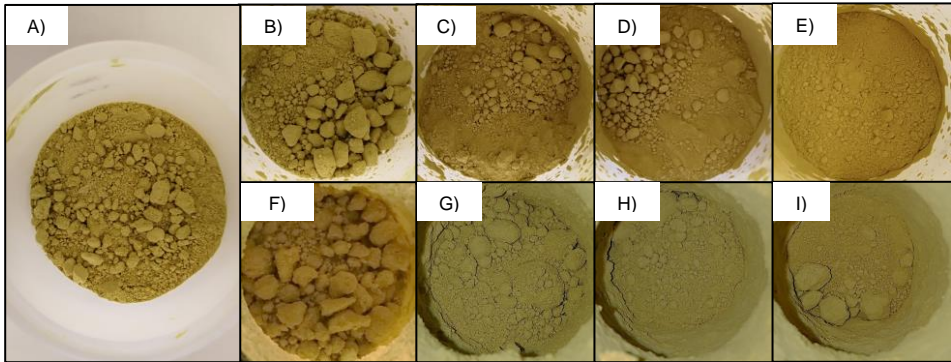


Abbildung 48: Fotos von Hopfenextrakt-Kapseln zur Beurteilung der Rieselfähigkeit A) am Produktionstag, B)–E) im HDPE-Behälter und F)–I) in einer Braunglasflasche an den Tagen 1, 9, 16 und 43 nach der Herstellung

Das Pulver neigte bereits am Produktionstag zur Bildung von Agglomeraten. Von Tag 0 auf Tag 1 ließ sich eine Zunahme der Agglomeratgröße beobachten. Vor allem im HDPE-Behälter nahm die Größe und Anzahl der Klumpen im Verlauf der 43 Tage deutlich ab, sodass in Bild E) ein sehr rieselfähiges Pulver zu erkennen ist. Auch in der Braunglasflasche nahm die Größe der Agglomerate im Verlauf der Lagerung ab. Allerdings sind auch nach 43 Tagen noch Klumpen zu sehen. Zudem hafteten die Kapseln an der Flaschenwand an.

Die Ausbildung von Agglomeraten kann verschiedene Gründe haben. Die Bildung von Feststoffbrücken kann ausgeschlossen werden, da die Klumpengröße im Verlauf wieder abnahm. Eine Möglichkeit ist, dass gebundenes Wasser und die damit verbundenen Kapillarkräfte in den Partikelzwischenräumen für das Zusammenlagern verantwortlich sind. Das Verdunsten des Wassers würde erklären, warum die Rieselfähigkeit im zeitlichen Verlauf zunahm, jedoch nicht, weshalb die Klebrigkeit von Tag 0 auf Tag 1 zunächst anstieg. Eine weitere Möglichkeit für Klumpenbildung ist die elektrostatische Anziehung, da die Partikeln durch Reibung eine Überschussladung erhalten können. Diese Anziehungskräfte sollten jedoch nicht im zeitlichen Verlauf geringer werden, da die Pulver vor der Aufnahme der Bilder geschüttelt wurden.

Um die Veränderungen der Rieselfähigkeit nachvollziehen zu können, wurde die Wasseraktivität der Pulver gemessen. Der Verlauf des a_w -Werts ist für beide Behältertypen in Abbildung 49 aufgetragen.

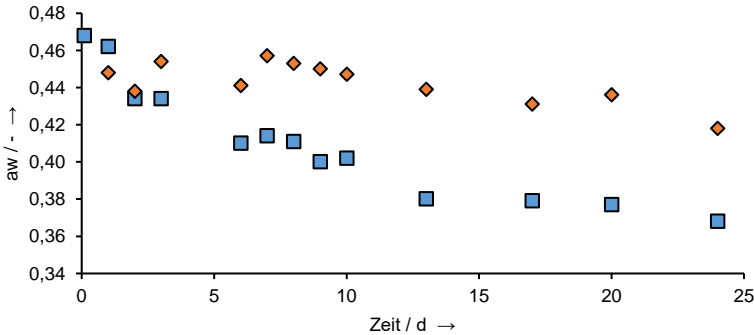


Abbildung 49: Verlauf des a_w -Werts von Hopfenextrakt-Kapselpulver über 24 Tage bei Lagerung im HDPE-Behälter \blacksquare und in einer Braunglasflasche \blacklozenge

Sowohl im HDPE-Behälter als auch in der Braunglasflasche war ein Rückgang der Wasseraktivität über die Zeit zu erkennen. Im Kunststoffbehälter nahm der a_w -Wert zunächst stark ab, später nur noch leicht. Am Tag 24 erreichte er seinen Tiefstwert von 0,37. Im Vergleich dazu war in der Braunglasflasche der Rückgang deutlich geringer. Am letzten Messtag betrug die Wasseraktivität noch 0,42.

Anhand des a_w -Werts kann der Rückgang der Klebrigkeit der Pulver ab Tag 1 nach der Produktion erklärt werden. Wie vermutet, werden die Partikeln aufgrund von Flüssigkeitsbrücken zusammengehalten. Die Abnahme der Wasseraktivität ist ein Beleg dafür, dass das gebundene Wasser im Pulver während der Lagerung verdunstet. Deshalb zerfallen Agglomerate nach mehreren Tagen. Das Austrocknen der Pulver verläuft im HDPE-Behälter schneller, da der Gasaustausch mit der Umgebung möglich ist. In der luftdichten Glasflasche stellt sich ein Gleichgewicht zwischen dem Wassergehalt der Probe und dem Partialdruck in der Luft im Behälter ein, weshalb das Verdunsten zum Stillstand kommt. Nur das Öffnen des Behälters zur Probenahme ermöglichte einen weiteren Abfall des a_w -Werts.

Die Abnahme der Wasseraktivität unterstützt die in Kapitel 4.6.2.1 aufgestellte These, dass die Emulgatoren in der Kapsel Wasser binden können und separate Kristalle ausbilden. Da diese Kristalle erst am Tag nach der Herstellung erkenntlich waren, liegt die Vermutung nahe, dass sie in Zusammenhang mit der verstärkten Agglomeration von Tag 0 auf Tag 1 stehen. Weil die Entstehung der neuen Kristallstruktur die Klebrigkeit der Partikeln erhöhte, müssen die Veränderungen auf der Kapseloberfläche

vorliegen. Dies ist plausibel, da die hydrophilen Teile der Emulgatoren das Bestreben besitzen, aus dem lipophilen Matrixmaterial hinauszuragen. Es ist möglich, dass sich die Emulgatoren erst innerhalb der ersten 24 Stunden auf der Kapseloberfläche anordnen und durch die gebundene Feuchte die Klebrigkeit erhöhen. In dem Fall müsste sich auch die Benetzung der Kapseln stark verändern. Die zeitliche Veränderung der Dispergierbarkeit des Pulvers wurde deshalb ebenfalls untersucht.

4.6.2.3 Veränderungen im Dispergierverhalten

Zur Untersuchung der Dispergierbarkeit der Kapseln wurden die im HDPE-Behälter gelagerten Proben im Laserbeuger gemäß der in Kapitel 3.2.4.2 beschriebenen Methode analysiert. Die Pulver wurden zunächst 25 Minuten lang (30 Messungen) mit dem Rührer dispergiert, bevor der Ultraschall aktiviert wurde. Da sich Veränderungen im Dispergierverhalten in erster Linie am $x_{90,3}$ -Wert erkennen lassen, werden für die Auswertung die Mittelwerte der letzten fünf Messungen vor Aktivierung des Ultraschalls und nach dem Abschalten des Ultraschalls herangezogen. Die Ergebnisse der ersten 14 Tage sind in Abbildung 50 dargestellt.

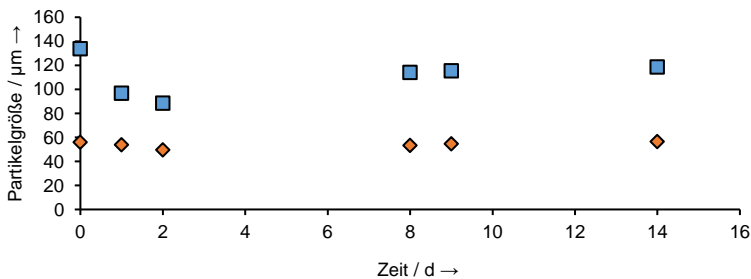


Abbildung 50: Auftragung der $x_{90,3}$ -Werte von Hopfenextrakt-Kapseln über die Lagerzeit. Dargestellt sind die Mittelwerte der letzten fünf Messungen vor Aktivierung des Ultraschalls ■ und nach dem Abschalten des Ultraschalls ◆

Am Tag der Produktion betrug der $x_{90,3}$ -Wert 133 µm vor Aktivierung des Ultraschalls. An Tag 1 und 2 war ein deutlicher Abfall des Werts auf 97 µm bzw. 89 µm festzustellen. Im weiteren Verlauf stieg der Kennwert erneut an, veränderte sich ab Tag 8 jedoch nur noch geringfügig. Die Kennwerte nach dem Abschalten des Ultraschalls befinden sich auf demselben Niveau zwischen 50 µm und 56 µm.

Unmittelbar nach der Produktion war das Pulver nur schwer dispergierbar. Der hohe $x_{90,3}$ -Wert zeigt, dass Agglomerate nur geringfügig aufgebrochen

werden konnten. Analog zu den Beobachtungen der Rieselfähigkeit ist der deutlichste Unterschied zwischen Tag 0 und Tag 1 festzustellen. Der Abfall des Kennwerts belegt, dass die Kapseln besser benetzt werden und durch den Röhreintrag zu einem höheren Grad vereinzelt werden konnten. Die Messwerte nach Abschalten des Ultraschalls zeigen, dass sich die Größe der Einzelpartikeln über die Zeit nicht veränderte. Die Ergebnisse stützen die Vermutung, dass die Umkristallisation von Tag 0 zu Tag 1 dazu führte, dass der Emulgator auf der Kapseloberfläche vorliegt. Auch Versuche mit anderen Kapselrezepturen haben gezeigt, dass eine Verbindung zwischen Klebrigkeit der Kapseln und Dispergierbarkeit besteht. Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass eine Zunahme der Klebrigkeit auf die Anwesenheit von Emulgatoren auf der Kapseloberfläche zurückzuführen ist. Der erneute Anstieg der $x_{90,3}$ -Werte im weiteren Verlauf ist vermutlich auf die Ausbildung von Feststoffbrücken zwischen den Kapseln zurückzuführen. Diese können zustande kommen, indem der für die Klebrigkeit verantwortliche Wasserfilm auf der Kapseloberfläche mit der Zeit verdunstet. Dabei kristallisieren gelöste Emulgator- bzw. Lipidmoleküle aus, wodurch sich Feststoffbrücke an den Kontaktstellen bilden. Im Laserbeuger konnten die Bindungen größtenteils mithilfe von Ultraschall wieder aufgebrochen werden.

4.6.2.4 Veränderungen der Wirkstofffreisetzung

Zuletzt wurde untersucht, ob die strukturellen Veränderungen in der Kapsel einen Einfluss auf die Wirkstofffreisetzung haben. Um einen Abbau der Wirkstoffe während des Versuchszeitraumes ausschließen zu können, wurden der Variante 0,5 % Tocopherol und 0,2 % Ascorbinsäure zugegeben. Das Pulver wurde bei 20 °C in einem HDPE-Behälter gelagert. Die Freisetzung der Wirkstoffe erfolgte unmittelbar nach der Produktion und an den Tagen 1, 2 und 7. Die Ergebnisse sind in Abbildung 51 dargestellt.

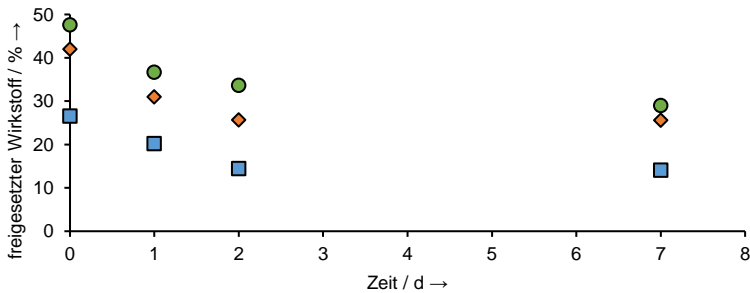


Abbildung 51: Freisetzung der Wirkstoffe in Abhängigkeit des Probenalters. Lupulone ■, Humulone ◆ und Xanthohumol ●

Die Freisetzung war am Tag der Produktion für alle drei Wirkstoffgruppen am höchsten. Es wurden ca. 27 % der Lupulone, 42 % der Humulone und 48 % des Xanthohumols aus der Kapsel gelöst. Im Verlauf der ersten beiden Tage nach der Produktion nahm die Freisetzung deutlich ab und veränderte sich im Anschluss nur noch geringfügig. Im Vergleich zu Tag 2 war an Tag 7 nur im Hinblick auf Xanthohumol ein Rückgang um 5 % zu erkennen. Die Freisetzung der anderen Wirkstoffe blieb konstant.

Im Gegensatz zur Rieselfähigkeit und Dispergierbarkeit der Kapseln lässt sich für die Wirkstofffreisetzung von Beginn an ein einheitlicher Trend erkennen: Je älter die Pulver, desto weniger Wirkstoffe werden freigesetzt. Die Abnahme der Freisetzung ist zu Beginn am höchsten und wird nach zwei Tagen sehr gering. Damit ähnelt sie in ihrem Verlauf dem Anteil der α -Konfiguration der Lipidmatrix aus Abbildung 47 (S. 114). Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, dass ein Zusammenhang zwischen der Struktur des Matrixmaterials und der Wirkstofffreisetzung besteht. Je höher der Anteil der thermodynamisch instabileren α -Form, desto mehr Wirkstoff konnte aus der Kapsel herausgelöst werden. Möglich ist, dass die Diffusion durch das hexagonale Gitter schneller abläuft als beim triklinen System der β -Konfiguration. Die Diffusionsfront befand sich bei jüngeren Pulvern aus diesem Grund weiter im Kapselinneren. Anders als bei der Dispergierung spielt es bei der Wirkstofffreisetzung keine Rolle, ob auf der Kapseloberfläche Emulgator vorliegt. Entscheidend für das Herauslösen der Wirkstoffe ist der in der Kapselmatrix eingebaute Lösungsvermittler.

Mithilfe der Versuche konnte gezeigt werden, dass die Struktur der Kapsel einen Einfluss auf die Produkteigenschaften hat. Zeitliche Modifikationen in der Konfiguration haben die Rieselfähigkeit und Dispergierbarkeit verändert und zu einer verringerten Wirkstofffreisetzung geführt.

Allerdings sind die Veränderungen nach sieben Tagen vernachlässigbar gering. Da zwischen Produktion und Anwendung im Feld mit hoher Wahrscheinlichkeit mehr Zeit verstreichen wird, können die Eigenschaften der Hopfenextrakt-Kapseln als stabil bezeichnet werden.

Es muss beachtet werden, dass die aufgestellten Thesen nur für die verwendete Kapselrezeptur gültig sind. Da die Adjuvanten im Matrixmaterial gelöst werden, kann die Kristallstruktur sehr stark von ihnen beeinflusst werden. Beispielsweise führte der Zusatz von 20 % des Mono-/ Diglycerids Softenol 3995 zu einem sehr unterschiedlichen Schmelzverlauf in der DSC-Messung (siehe Abbildung 64 im Anhang). Durch den geringen Anteil des TAGs waren dessen charakteristischen Schmelzpeaks nicht mehr zu erkennen. Bei dieser Variante kam es – wie in Kapitel 4.4.3 beschrieben – zum Zerfall der Kapseln bei Kontakt mit Wasser. Das Verschwinden der Schmelzpeaks des Matrixmaterials kann demnach mit der Destabilisierung der Kapsel in Verbindung gebracht werden.

4.7 Untersuchungen zur Retention der Kapseln auf hydrophober Oberfläche

Suspensionsstabilität und Dispergierung der Kapseln in Wasser sind die Grundlagen für ein homogenes Ausbringen auf die Pflanzen. Letztlich ist jedoch der Kontakt zwischen Suspensionstropfen und Blattoberfläche für die gleichmäßige Verteilung entscheidend. Gemäß der in Kapitel 3.2.8 beschriebenen Methode wurde die Qualität des Sprühbelags auf hydrophober Oberfläche untersucht. Zur Beurteilung wurden die Verteilung der Kapseln und die Anzahl anhaftender Partikeln nach Antrocknen und nach Abwaschen betrachtet.

4.7.1 Auswirkung von Emulgatoren auf die Retention

Die Integration von Emulgatoren hat sich als essenziell für die Dispergierbarkeit der Kapseln und Freisetzung der Wirkstoffe gezeigt. Die Rolle der Emulgatoren bei der Benetzung von hydrophoben Oberflächen und Anhaften der Kapseln soll im Vergleich von zwei Varianten herausgefunden werden. Dazu wurden Kapseln ohne und mit Tensiden hergestellt. Die Kapselrezeptur der emulgatorhaltigen Variante setzte sich aus 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 %

C-1616 zusammen. Ohne Emulgatoren bestand die Kapsel aus 85 % gehärtetem Rapsöl und 15 % Hopfenextrakt.

In einer ersten Versuchsreihe wurde untersucht, wie viele Kapseln auf die Versuchsplatten bei verschiedenen Aufprallwinkeln zwischen Tropfen und Oberfläche aufgetragen werden können. Dafür wurden die Platten auf eine Halterung gelegt, um den Winkel einzustellen. Untersucht wurden die Positionen bei Winkeln von 0° (horizontal), 15° und 30° . Dabei zeigten die beiden Varianten sehr unterschiedliche Benetzungsmuster. Der Spritzbelag bei Platten in flacher Stellung ist in Abbildung 52 abgebildet.

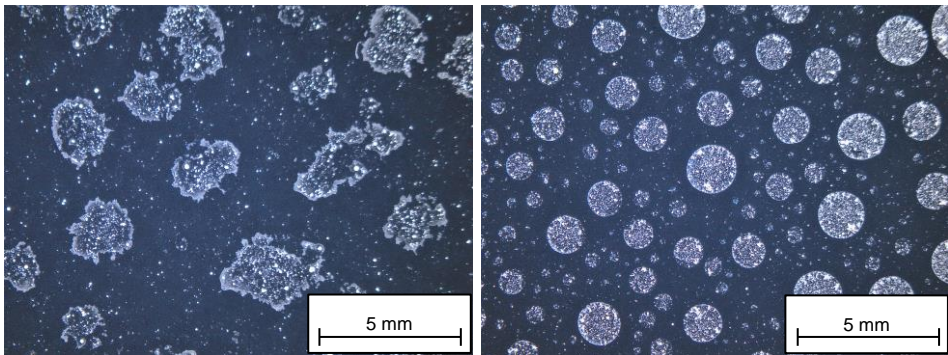


Abbildung 52: Spritzbelag auf Platten in flacher Position von Kapseln mit (links) und ohne Emulgator (rechts) in siebenfacher Vergrößerung

Auf dem Bild der Kapseln ohne Emulgator sind runde Anhäufungen von Partikeln zu erkennen, wobei in den Zwischenräumen kaum Kapseln zu finden sind. Mit Emulgator war ein Spreiten der Wassertropfen zu erkennen, was zu unregelmäßigen Anhäufungen von Partikeln führte, die eine größere Fläche einnehmen. Außerdem sind mehr Kapseln in den Zwischenräumen zu finden. Der Zusatz von Emulgatoren bewirkte eine gleichmäßigere Verteilung der Kapseln auf den Platten. Zur Auswertung wurde die Anzahl der Partikel pro Plattenausschnitt bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 53 als Boxplot dargestellt.

4 Ergebnisse und Diskussion

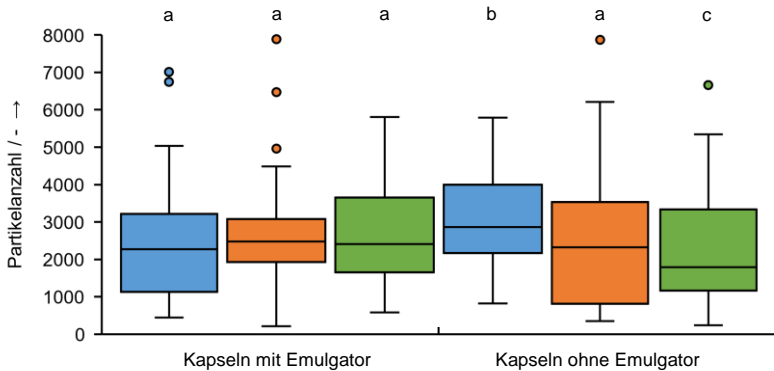


Abbildung 53: Boxplot der Partikelanzahl je Auszählungsquadrat mit und ohne Emulgator auf lackierten Platten, die in verschiedenen Winkeln besprüht wurden. 0° (horizontal) ■, 15° ■ und 30° ■. Die statistische Gruppe ist mit a-c markiert

Bei der Variante mit Emulgator bleibt der Medianwert der Partikelanzahl bei ca. 2300 Partikeln unabhängig vom Winkel der Platte konstant. Der Median der Kapseln ohne Emulgatoren hingegen fällt bei größeren Winkeln von 2900 in flacher Position auf 2300 bei 15° und 1800 bei 30°. Auch die statistische Analyse zeigte, dass die Ergebnisse der Kapseln mit Emulgator keinen signifikanten Unterschied aufweisen. Die Werte der Variante ohne Emulgator hingegen gehören unterschiedlichen statistischen Gruppen an.

Bei flacher Position wurde auf den Platten mit Kapseln ohne Emulgator signifikant mehr Partikel detektiert als bei Partikeln mit Emulgator. In dieser Stellung war zu erwarten, dass dieselbe Anzahl an Partikeln anhaftet, weil Effekte durch Benetzung vernachlässigt werden können. Dass dies nicht so ist, liegt an der Auswertungsmethode: Mit der digitalen Bildauswertung werden sehr kleine Partikeln nicht erkannt. Kapseln mit Emulgator werden deutlich besser vereinzelt, weshalb der Anteil an nicht erkannten Partikeln größer ist.

Bei Kapseln mit Emulgator blieben unabhängig vom Winkel der Platten dieselbe Partikelzahl zurück. Das Spreiten der Suspensionstropfen verhinderte ein Abrollen. Im Gegensatz dazu führte der geringe Kontaktwinkel der Suspensionstropfen ohne Emulgatoren zum Abperlen, sobald die Platten geneigt waren. Da die Blätter unter Realbedingungen nicht horizontal ausgerichtet sind und sie zudem beweglich sind, würde es zu einem Verlust des Pflanzenschutzmittels kommen. Die integrierten Emulgatoren tragen also dazu bei, dass mehr Kapseln auf die Pflanze aufgetragen werden können.

Eine weitere Versuchsreihe wurde durchgeführt, um den Einfluss der Emulgatoren auf die Regenresistenz der Kapseln zu bewerten. Zunächst wurden die Platten in horizontaler Position mit Kapseln beschichtet. Nach Verdunsten des Wassers wurden die angetrockneten Kapseln mit Wasser in einem Winkel von 15° besprüht, sodass die Tropfen von der Platte ablaufen konnten. Die Anzahl der anhaftenden Partikeln vor und nach dem Abwaschen sind als Boxplot in Abbildung 54 dargestellt.

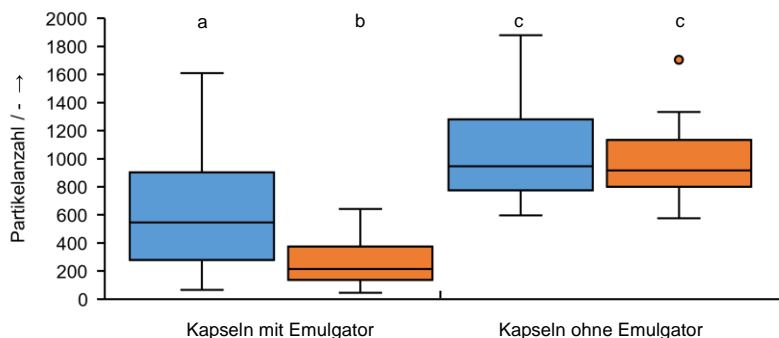


Abbildung 54: Boxplot der Partikelanzahl je Auszählungsquadrat mit und ohne Emulgator auf lackierten horizontalen Platten nach Auftragen ■ und nach Abwaschen mit Wasser ■. Statistische Gruppe a-c

Wie im Versuch zuvor wurden auf den horizontalen Platten mit emulgatorhaltigen Kapseln weniger Partikeln ausgezählt als bei der Vergleichsvariante. Im Vergleich vor und nach dem Abwaschen ist bei Kapseln mit Emulgator ein signifikanter Abfall des Medianwerts von 550 auf 210 Partikeln pro Quadrat zu erkennen. Ohne integriertem Emulgator fiel der Median nur geringfügig von 950 auf 920 Kapseln. Im Rahmen der statistischen Auswertung handelt es sich dabei um keinen signifikanten Unterschied.

Da zur Herstellung der Mikro kapseln mit Hopfenextrakt lipophile Matrixmaterialien verwendet werden, haften die Partikeln ohne internen Emulgator stark an der hydrophoben Oberfläche an. Die gebildeten Haftkräfte sind ausreichend, um ein Abwaschen der Partikeln im Versuch weitestgehend zu verhindern. Der Einsatz von Emulgatoren verschlechterte die Regenresistenz deutlich. Die adhäsiven Kräfte werden bei Kontakt mit Wasser wieder gelöst, da die Kapseln bzw. die herausgelösten Substanzen aufgrund der Tenside benetzbar sind.

Der Zusatz von Emulgatoren hat sowohl positive als auch negative Auswirkung auf die Retention der Kapseln auf hydrophober Oberfläche. Zwar ermöglichen sie eine homogene Beschichtung unabhängig vom

Winkel der Platte, jedoch wird die Regenresistenz stark verringert. Fraglich ist, ob unter realen Bedingungen die Vorteile oder die Nachteile überwiegen. Es muss berücksichtigt werden, dass die Blätter in allen möglichen Positionen ausgerichtet sind und die Retention deutlich stärker beeinflusst wird als im Versuch. Außerdem besitzen die Hopfenblätter eine ausgeprägte Rauigkeit, was die Benetzung mit Wasser erschwert und die positiven Eigenschaften der Emulgatoren weiter hervorheben sollte. Im Hinblick auf die Dispergierung der Kapseln in Wasser und die Freisetzung der Wirkstoffe sind die Emulgatoren für die Funktion des Pflanzenschutzmittels ohnehin essenziell. Eine Verbesserung der Regenfestigkeit kann deshalb nur unabhängig von den Emulgatoren erfolgen.

4.7.2 Auswirkung von Haftmitteln auf die Regenresistenz

Zur Erhöhung der Regenresistenz können weitere Additive – sogenannte Haftmittel – eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die Regenresistenz mit den in Kapitel 3.1.6 beschriebenen Substanzen zu verbessern. Sie werden ins Wasser der Spritzbrühe hinzugefügt und sollen für eine bessere Blattbenetzung sowie für bessere Regenfestigkeit sorgen. Bei den Haftmitteln handelt es sich um Wachsemulsionen mit nichtionischen oder anionischen Tensiden. Das enthaltene Wachs soll nach Applikation eine regenabweisende Schicht über dem Pflanzenschutzmittel bilden. Auch für diesen Versuch wurde die Kapselvariante mit 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616 verwendet. Die Haftmittel wurden zu einer Konzentration von 0,1 w% zur Kapselsuspension hinzugegeben. Die unterschiedlichen Spritzbrühen wurden auf horizontal gelegene Platten aufgetragen, um einen Einfluss durch ein Abprallen der Tropfen zu vermeiden. Die Anzahl der anhaftenden Partikeln wurde sowohl nach Beschichtung als auch nach Beregnung der Platten ausgezählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 55 als Boxplots aufgetragen.

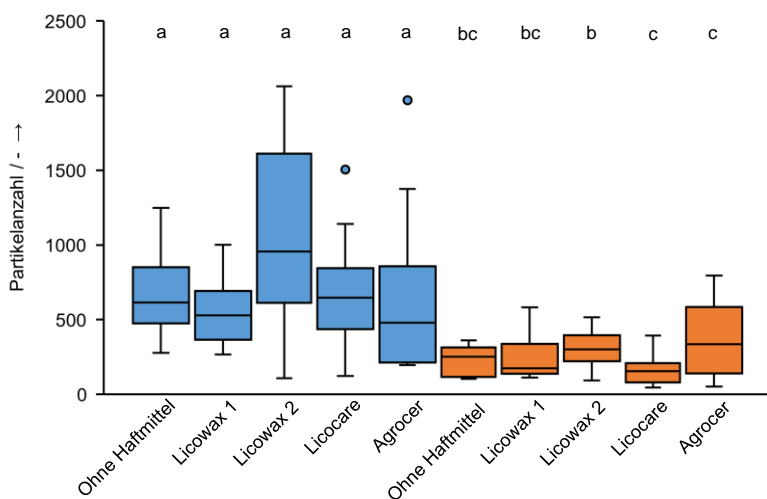


Abbildung 55: Boxplot der Partikelanzahl je Auszählungsquadrat auf lackierten Platten nach Auftragen ■ und nach Abwaschen mit Wasser ■ in Abhängigkeit von verschiedenen Haftmitteln. Statistische Gruppen a-c

Nach Beschichtung der Platten wurden unabhängig des Zusatzes von Haftmittel eine ähnliche Anzahl an Partikeln gezählt. Der Medianwert ist bei Zusatz von Licowax 2 mit 960 Partikeln pro Bild am höchsten und mit Agrocer mit 480 am geringsten. Dennoch gehören alle Varianten der gleichen statistischen Gruppe an. Dies ändert sich nach Absprühen der Platten mit Wasser. Bei allen Proben sind signifikante Abnahmen der Partikelanzahl festzustellen. Vergleicht man die Proben untereinander, können zwei verschiedene statistische Gruppen unterschieden werden. Licowax 2 und Agrocer gehören derselben Gruppe an. Licocare gehört einer zweiten Gruppe an, bei der eine geringere Anzahl an Partikeln gemessen wurde. Die Variante ohne Haftmittel und Licowax 1 gehören beiden Gruppen an. Aus diesem Grund konnte im Vergleich zum Pulver ohne Haftmittel kein signifikanter Effekt der Haftmittel auf die Regenfestigkeit festgestellt werden.

Es entspricht den Erwartungen, dass nach Auftragen auf horizontale Platten die gleiche Partikelanzahl auf den Quadraten vorliegt. Dennoch sind die Medianwerte sehr unterschiedlich und die Anzahl der Partikeln innerhalb einer Messreihe unterliegen einer starken Streuung. Dies ist auf die Verteilung der Kapseln zurückzuführen, weil die Varianten – wie in Abbildung 52 (S. 121) zu erkennen – ein Fleckenmuster auf den Platten bildeten. Da die Bildauswertung mithilfe von Aufnahmen unter 32-facher Vergrößerung erfolgte, ergaben sich große Unterschiede – je nachdem, ob

ein getrockneter Tropfen, oder der Zwischenraum abgebildet war. Für aussagekräftigere Daten müssten deshalb mehr Quadrate pro Variante ausgewertet werden. Nach dem simulierten Niederschlag lassen sich Unterschiede zwischen den Haftmitteln feststellen, jedoch sind die Veränderungen im Vergleich zu den Kapseln ohne Haftmittel nicht signifikant. Es lässt sich deshalb lediglich urteilen, dass die Regenfestigkeit von Licocare geringer als bei Licowax 2 und Agrocet ist.

Generell haben die Haftmittel nicht zu einer signifikanten Verbesserung der Regenresistenz geführt. Sollte sich eine Wachsschicht gebildet haben, konnte sie das Auflösen der Haftkräfte bei Nässe nicht verhindern. Zurückgeführt werden kann dies entweder auf die Emulgatoren der Kapseln oder auf die Tenside im Haftmittel selbst. Zusätzlich können die Mittel unter ungünstigen Bedingungen den Gasaustausch durch die Stomata beeinträchtigen und die Pflanze schädigen [97]. Für die Hopfenextrakt-Kapseln wird deshalb auf einen Einsatz der Haftmittel verzichtet.

4.8 Untersuchungen zur biologischen Wirksamkeit

Die Untersuchung der biologischen Wirksamkeit erfolgte in zwei Phasen: Zunächst anhand von Blattscheibenversuchen im Labor und später in einem Hopfengarten als Freilandversuch. Die Blattscheibenversuche ermöglichten die Untersuchungen von verschiedenen Parametern. Einerseits wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt, um die minimal notwendige Menge der Hopfenextrakt-Kapseln in der Spritzbrühe zu bestimmen. Andererseits dienten die Blattscheiben zur Aufklärung, wie die verschiedenen Kapselkomponenten die Wirksamkeit des Pflanzenschutzmittels beeinträchtigen.

4.8.1 Blattscheibenuntersuchungen

4.8.1.1 Dosis-Wirkungs-Kurve ohne Kapsel-internen Emulgator

Im ersten Schritt wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve von Kapseln ohne Adjuvanten erstellt. Sie dient zur Auswahl einer passenden Konzentration für den Vergleich verschiedener Varianten. Die Kapseln setzten sich aus 70 % Softenol 3169 und 30 % Hopfenextrakt zusammen. Da ohne integrierten Emulgator kein Dispergieren des Pulvers in Wasser möglich wäre, wurde in die Suspension 2 % Tween 60 beigemischt. Die Dosis wurde über die Kapselmenge reguliert. Die Versuchsdurchführung erfolgte gemäß der in Kapitel 3.2.10 beschriebenen Methode. Zur Auswertung wurde der Wirkungsgrad nach Abbott herangezogen. Die Ergebnisse der Blattscheibenversuche sind in Abbildung 56 als Boxplot zusammengefasst. Zum Vergleich ist das kupferhaltige Vergleichsmittel Cuprozin Progress (mit einer Konzentration von 500 mg Reinkupfer pro Liter) ebenfalls aufgeführt. Die Mengenangaben des Hopfenextrakts beziehen sich auf die Konzentration des Reinstoffs in der Spritzbrühe.

Wirkstoffe auf der Partikeloberfläche vor. Die Freisetzung ist demnach nicht zwingend notwendig, damit die fungiziden Komponenten mit dem Pathogen in Kontakt kommen können.

Anhand der durchgeführten Versuche ist es nicht möglich, den zugrundeliegenden Wirkmechanismus der Hopfenextrakt-Kapseln aufzuklären. Unabhängig davon müsste eine erhöhte Freisetzung zu einer verbesserten Wirkung führen. Im Folgenden wurden deshalb Varianten mit hoher Wirkstofffreisetzung untersucht. Auf Grundlage der Dosis-Wirkungs-Kurve wurde eine Konzentration von 0,25 % Hopfenextrakt in der Spritzbrühe gewählt.

4.8.1.2 Vergleich verschiedener Matrixmaterialien

In Kapitel 4.1 wurden mehrere Matrixmaterialien als „verkapselungstauglich“ im Hinblick auf die Rieselfähigkeit der Pulver und der Wirkstoffstabilität eingestuft. Die gehärteten Fette auf Basis von Raps-, Rizinus- und Sonnenblumenöl wurden aufgrund ihrer Verfügbarkeit und niedrigen Kosten für die Blattscheibenversuche ausgewählt. Die untersuchten Kapseln setzten sich aus 40 % des Matrixmaterials, 30 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1816 zusammen. Die Wirkstofffreisetzung und der Wirkungsgrad nach Abbott der Varianten ist in Abbildung 57 abgebildet.

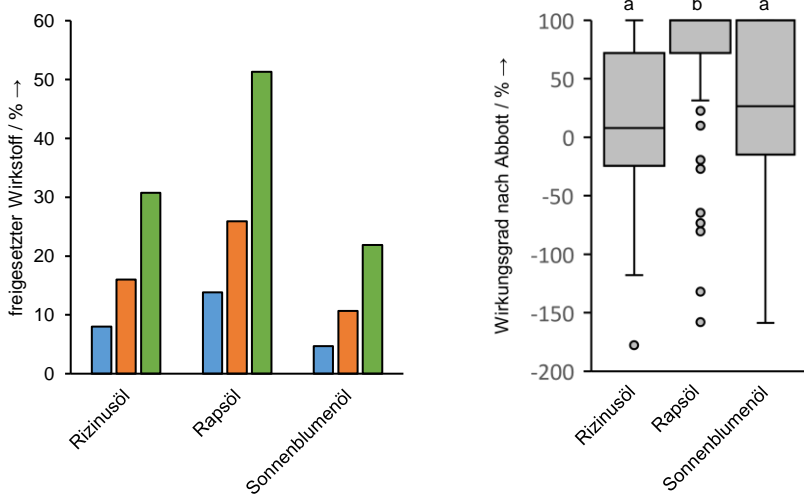


Abbildung 57: Freigesetzte Wirkstoffe (links) und biologische Wirksamkeit (rechts) von Hopfenextrakt-Kapseln in Abhängigkeit des Matrixmaterials. Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumol ■. Statistische Gruppen a und b

Die Wirkstofffreisetzung war bei Kapseln mit gehärtetem Rapsöl am höchsten. Es wurden 14 % Lupulone, 26 % Humulone und 51 % von Xanthohumol herausgelöst. Bei Verwendung von gehärtetem Sonnenblumenöl war die Freisetzung am geringsten. Betrachtet man die biologische Wirksamkeit, fällt auf, dass die Variante mit Rapsöl ebenfalls die höchste Wirksamkeit besitzt. Der Median der Versuche lag bei einem Wirkungsgrad von 100 %. Sowohl Rizinusöl als auch Sonnenblumenöl wiesen deutlich geringere Wirkungsgrade mit einer hohen Streuung auf. Die Medianwerte lagen bei 8 % bzw. 27 %. Die statistische Auswertung zeigte, dass sich die Wirksamkeit von Rizinusöl und Sonnenblumenöl nicht signifikant unterschieden.

Die Unterschiede zwischen den Matrixmaterialien sind bereits bei der Wirkstofffreisetzung sehr deutlich. Sowohl bei Rizinusöl als auch bei Sonnenblumenöl war ein geringeres Herauslösen der Wirkstoffe zu beobachten. Im Hinblick auf Rizinusöl könnte dies teilweise auf die Wirkstoffstabilität zurückzuführen sein. Dadurch, dass höhere Temperaturen bei der Produktion notwendig waren, sind bei dieser Variante weniger der temperaturempfindlichen Wirkstoffe enthalten. Bei Sonnenblumenöl muss jedoch ein anderer Grund vorliegen, da bei dem Matrixmaterial die höchste Stabilität beobachtet wurde (vgl. S.69, Tabelle 10). Die Begründung muss in der Wechselwirkung zwischen den Emulgatoren und dem Lipid liegen. Es zeigte sich, dass nicht nur die Freisetzung, sondern auch die Dispergierbarkeit und Suspensionsstabilität bei Verwendung von Sonnenblumenöl in Kombination von Brij S20 und C-1816 verringert war. So fiel die Suspendierbarkeit mit 74 % etwa um 10 % geringer aus als bei den anderen Lipiden. Es ist davon auszugehen, dass die untersuchte Emulgatorkombination unpassend für gehärtetes Sonnenblumenöl ist.

Die verschlechterten Kapseleigenschaften wirkten sich sehr stark auf die Wirksamkeit der Kapseln aus. Dass der Unterschied so deutlich ausfällt, kann auf die verwendete Konzentration zurückgeführt werden. Da die Aufwandmenge so gewählt wurde, dass sie am Abbruch der sigmoidal verlaufenden Dosis-Wirkungs-Kurve liegt (vgl. S.128, Abbildung 56), führten selbst geringfügige Verschlechterungen zu einem deutlichen Abfall der Wirksamkeit.

Mit der untersuchten Emulgator-Kombination zeigten die Kapseln mit gehärtetem Rapsöl die beste Freisetzung, was zur höchsten Wirksamkeit führte. Deshalb ist dieses Fett am besten für den mikroverkapselten Hopfenextrakt geeignet. Der Nachteil der etwas geringeren Wirkstoff-

stabilität gegenüber Sonnenblumenöl kann durch Zugabe von Antioxidantien kompensiert werden.

4.8.1.3 Optimale Wirkstoffbeladung

Die in Kapitel 4.3.3 vorgestellten Versuche haben gezeigt, dass die Halbierung des Extraktanteils von 30 % auf 15 % eine Abnahme der Pulverklebrigkeit, eine erhöhte Suspensionsstabilität und eine Halbierung der Wirkstofffreisetzung bewirkt. Anhand der Blattscheiben wurde untersucht, welche Auswirkung die Wirkstoffbeladung auf die biologische Wirksamkeit hat. Verglichen wurden erneut Varianten mit 30 % und 15 % Hopfenextrakt. Die weitere Zusammensetzung bestand aus 40 % bzw. 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Brij S20 und 15 % C-1816. Zur Vergleichbarkeit wurde in einem Versuch die Kapselmenge konstant gehalten und in einem weiteren die Wirkstoffkonzentration. Die Ergebnisse sind in Abbildung 58 als Boxplots dargestellt.

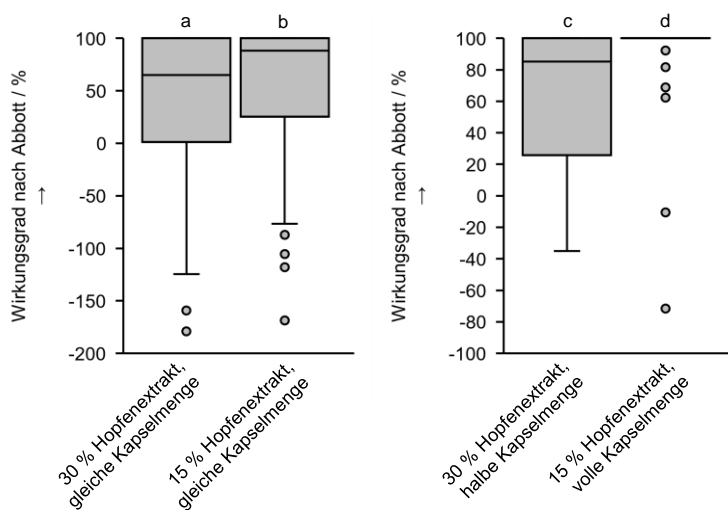


Abbildung 58: Biologische Wirksamkeit von Hopfenextrakt-Kapseln in Abhängigkeit der Wirkstoffbeladung: bei gleicher Kapselmenge (links) und bei gleicher Wirkstoffmenge (rechts). Statistische Gruppen a-d

Bei gleichbleibender Kapselmenge ergaben sich Medianwerte von 65 % bei 30 % Wirkstoffbeladung und 88 % bei 15 % Wirkstoffbeladung. Obwohl bei beiden Varianten eine sehr breite Verteilung zu beobachten war, ist der Unterschied als signifikant zu bewerten. Bei gleichbleibender Wirkstoffmenge ist die Differenz noch deutlicher. Bei 30 % Wirkstoffbeladung und halber Kapselaufwandmenge ergab sich ein Wirkungsgrad-Median von

85 % mit hoher Streuung. Nach Behandlung mit der vollen Kapselaufwandmenge mit 15 %-ig beladenem Pulver war nur bei sechs Blattscheiben eine Infektion zu erkennen, weshalb der Median des Wirkungsgrads bei 100 % lag.

Im Versuch bei konstanter Kapselmenge konnte bei halber Wirkstoffkonzentration ein höherer Wirkungsgrad erreicht werden. Einerseits ist dies erstaunlich, da die Wirkstofffreisetzung bei geringerer Beladung deutlich niedriger ist. Andererseits waren die Pulver mit 15 % Beladung deutlich rieselfähiger und stabiler in Suspension. Vermutlich führte dies im Versuch zu einer homogeneren Ausbringung der Kapseln auf die Blattscheiben. Diese Vermutung konnte anhand eines Versuchs mit beschichteten Platten (dargestellt in Abbildung 65 im Anhang) belegt werden. Da der Wirkstoff in den Kapseln immobilisiert wird, müssen die Partikel möglichst homogen auf der gesamten Blattoberfläche verteilt werden. Existieren Bereiche ohne Kapselbelag können die Sporen die Stomata des Blatts infizieren. Sehr deutlich wird dies bei Betrachtung der halbierten Kapselmenge bei gleichbleibender Wirkstoffdosis. Blattscheiben, die mit Kapseln mit 30 % Hopfenextrakt behandelt wurden, konnten nicht zuverlässig geschützt werden, da die Verteilung zu inhomogen war und deshalb viele ungeschützte Stellen vorlagen. Die 15 %-ige Variante hingegen bot einen nahezu perfekten Schutz, da mehr Partikeln einen homogeneren Spritzbelag erzeugen.

Der Vergleich zeigt, dass die Verteilung auf dem Blatt eine wichtigere Rolle als die Freisetzung der Wirkstoffe spielt, weil der Kontakt zwischen Pathogen und Kapsel zum Schutz der Pflanze entscheidend ist. Während der Produktentwicklung wurde die beste Vereinzelung der Kapseln bei Zusatz des Dispergiermittels Atlox 4913 erreicht. Aus diesem Grund wurde im Blattscheibenversuch auch diese Variante mitgeführt. Da der Wirkungsgrad der Variante mit 15 % Hopfenextrakt bereits ohne Dispergiermittel 100 % betrug, war bei der verwendeten Dosis keine weitere Verbesserung möglich (siehe Abbildung 66 im Anhang). Aufgrund des begrenzten Umfangs der Blattscheibenversuche konnte kein Wiederholungsversuch bei niedriger Konzentration durchgeführt werden. Die gezeigten Versuche lassen jedoch vermuten, dass die Variante mit besserer Vereinzelung der Partikeln bei gleicher Freisetzung die zuverlässigere Schutzwirkung besitzt.

4.8.1.4 Dosis-Wirkungs-Kurve einer möglichen Kapselvariante

In den vorhergehenden Versuchen wurde festgestellt, dass die Suspensionsstabilität, die Dispergierbarkeit und die Freisetzung der Wirkstoffe die Wirksamkeit gegen den Falschen Mehltau beeinflussen. Es kann angenommen werden, dass die bisher wirksamste Variante (mit Rapsöl und 15 % Extraktanteil) in Kombination mit dem Dispergiermittel Atlox 4913 sehr vielversprechend ist, da sie die genannten Anforderungen unter den entwickelten Kapselpulvern am besten erfüllte. Aus diesem Grund wurde eine weitere Dosis-Wirkungs-Kurve dieser Kapseln erstellt. Sie setzen sich aus 50 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20, 15 % C-1616 und 5 % Atlox 4913 zusammen. Der Wirkungsgrad nach Abbott ist in Abbildung 59 gegen die Aufwandmenge aufgetragen. Zusätzlich ist die Wirksamkeit des kupferhaltigen Vergleichsmittels Cuprozin Progress abgebildet.

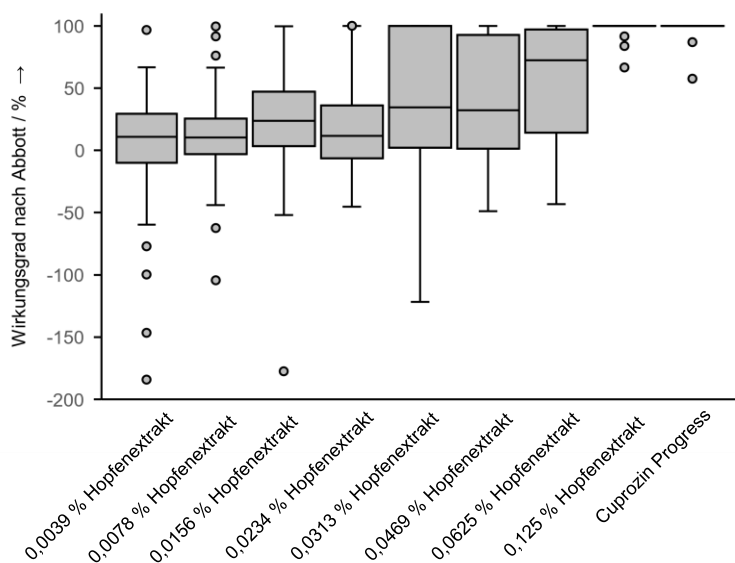


Abbildung 59: Wirkungsgrad nach Abbott in Abhängigkeit der Wirkstoffkonzentration in Wasser. Dargestellt sind Hopfenextrakt-Kapseln aus 50 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20, 15 % C-1616 und 5 % Atlox 4913 im Vergleich zu Cuprozin Progress

Die Kapseln zeigten bereits ab einer Aufwandmenge von 0,0078 % Hopfenextrakt in der Spritzbrühe einen signifikanten Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Der Medianwert lag bei etwa 10 %. Erst ab einer Dosis zwischen 0,0469 % und 0,0625 % stieg die Wirksamkeit sehr deutlich an, wobei die Streuung sehr groß war. Ab

0,125 % Hopfenextrakt in der Spritzbrühe betrug der Wirkungsgrad 100% und war vergleichbar mit Cuprozin Progress. Der Abbruch der Kurve lag zwischen 0,0625 % und 0,125 %.

Schon ab sehr geringen Konzentrationen konnte ein Effekt der Kapseln beobachtet werden, jedoch war ein verlässlicher Schutz der Blattscheiben erst ab 0,125 % Hopfenextrakt gewährleistet. Interessant ist der Vergleich mit der Kurve von Kapseln ohne jegliche Adjuvanten. Hierzu sind in Abbildung 60 die Mittelwerte der beiden Dosis-Wirkungs-Kurven gegen die Konzentration aufgetragen.

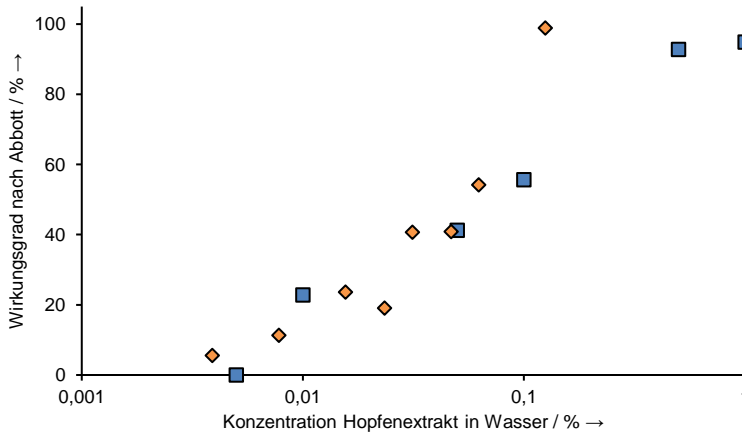


Abbildung 60: Auftragung der Mittelwerte der Dosis-Wirkungskurven von Hopfenextrakt-Kapseln ohne (□) und mit (♦) Adjuvanten

Im Vergleich ist ersichtlich, dass sich die Mittelwerte der Wirksamkeit beider Varianten bis zu einer Aufwandmenge von 0,1 % kaum unterschieden. Bei den Kapseln mit Hilfsmitteln war ein sprunghafter Anstieg auf 99 % Wirksamkeit bei einer Konzentration von 0,125 % festzustellen, während der Mittelwert der Vergleichsvariante ohne Adjuvanten selbst bei einer Konzentration von 1 % nur 95 % betrug.

Bei geringeren Konzentrationen reicht die Dosis nicht aus, um eine Infektion der Blattscheiben zu verhindern. Der für Dosis-Wirkungs-Kurven typische sigmoidale Verlauf hat zur Folge, dass der Zusatz von Additiven keinen Einfluss auf die Befallsstärke bei zu geringen Konzentrationen hatte. Erst der sprunghafte Anstieg der Wirksamkeit zeigt die Auswirkung der Adjuvanten: Die für einen 100 %-igen Schutz notwendige Konzentration der Kapseln mit Adjuvanten liegt im Bereich zwischen 0,0625 % und 0,125 % Hopfenextrakt. Für die Kapseln ohne Hilfsmittel liegt sie im Bereich zwischen 0,1 % und 1 %. Beim Vergleich muss bedacht

werden, dass die Kapseln ohne Additive mit 30 % Wirkstoff beladen waren und deshalb nur die Hälfte der Kapselmenge aufgetragen wurde. Wie in Kapitel 4.8.1.3 diskutiert, hat die Kapselmenge einen großen Einfluss auf die Wirksamkeit, da die mit Partikeln belegte Fläche entscheidend ist. Ob der Zusatz von Additiven im Rahmen der Blattscheibentests tatsächlich von Vorteil ist, lässt sich anhand der Versuche deshalb nicht eindeutig aufklären. Es ist jedoch anzumerken, dass die Anwendbarkeit der Kapseln ohne interne Adjuvanten selbst nach Zugabe von 2 % Tween 60 ins Wasser bereits im Labormaßstab sehr schlecht war. Es war kaum möglich, die Kapseln im Wasser zu dispergieren. Die Formulierung mit Adjuvanten ist deshalb für den realen Fall deutlich besser geeignet. Weiterhin muss beachtet werden, dass es sich bei den Blattscheibentests um Modellversuche handelt, die Eigenschaften wie Anwendbarkeit, Wirkstoffstabilität und Retention der Kapseln auf den Blättern nicht berücksichtigen. Die Vorteile der Verkapselung sowie die tatsächlich benötigte Aufwandmenge müssen deshalb anhand von Feldversuchen bestimmt werden.

Dennoch soll an dieser Stelle eine erste Hochrechnung des benötigten Hopfenextrakts erfolgen, um eine Realisierbarkeit vorläufig abzuschätzen: Der Ertrag der Hopfenwirkstoffe muss höher sein als die Aufwandmenge als Pflanzenschutzmittel. Als Berechnungsgrundlage des Ertrags dienen die Eckdaten des Weltmarkts aus dem aktuellen Barth-Bericht 2017/2018 [98]. Die errechnete Erzeugung von Humulonen pro Hektar Anbaufläche beträgt im Durchschnitt ca. 0,19 t. Umgerechnet auf die Zusammensetzung des verwendeten Hopfenextrakts ergibt sich ein Ertrag von ca. 0,68 t Extrakt pro Hektar. Für die benötigte Aufwandmenge wird aus der Dosis-Wirkungs-Kurve der Wert 0,125 % Hopfenextrakt in der Spritzbrühe ausgewählt. Im Jahr werden auf einen Hektar Hopfen schätzungsweise ca. 10.100 l Spritzwasser ausgetragen (persönlicher Kommentar von Dr. Florian Weihrauch, Hopfenforschungszentrum Hüll). Umgerechnet mit der Rezeptur entspricht dies einer Extrakt-Menge von 12,6 kg. Zusammengefasst würden mit den verwendeten Daten 12,6 kg Hopfenextrakt ausreichen, um 680 kg zu erzeugen. Dies entspricht einem Anteil von 1,85 %, welcher vom Ertrag für den Pflanzenschutz des folgenden Jahres reserviert werden müsste. Auch wenn es sich um eine stark vereinfachte Hochrechnung handelt zeigt sie doch, dass nur ein geringer Anteil des Extrakts für den Schutz vor Falschem Mehltau verwendet werden müsste. Die Abschätzung unterstreicht das Potential der entwickelten Kapseln.

4.8.2 Freilandversuche

Für eine aussagekräftige Untersuchung des Pflanzenschutzmittels hinsichtlich seiner Anwendbarkeit und Wirksamkeit sind Freilandversuche unerlässlich. Sie haben den Nachteil, dass sie nur einmal im Jahr stattfinden können und der Befall mit Falschem Mehltau von den Witterungsbedingungen abhängt. Im Rahmen der Produktentwicklung wurden in den Jahren 2017 und 2018 je eine Variante der Hopfenextrakt-Kapseln untersucht. Sie wurden in Kombination mit einem kupferhaltigen Mittel gesprüht, um einen Vergleich mit anderen kupferfreien Mitteln, die ebenfalls mit Kupfer ausgebracht werden, zu ermöglichen. Die Anwendung fand in einem ökologisch bewirtschafteten Versuchshopfungarten in der Hallertau statt und wurde vom Hopfenforschungszentrum Hüll durchgeführt. Die Ausbringung erfolgte mit einem praxisüblichen Gebläsesprayer (Nobili-Gebläsesprayer Euro 105/2000, mit Dosiercomputer UNI-Control und Tankmeter-Durchflussmesser Polmac 2 von Müller-Elektronik, mit Turbodrop-Düsen bestückt). Pro Jahr wurde eine Variante der Hopfenextrakt-Kapseln untersucht. Da die Versuche parallel zur Produktentwicklung durchgeführt wurden, handelte es sich um unterschiedliche Zusammensetzungen. Im Jahr 2017 bestand das Pulver aus 55 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20 und 15 % C-1616. 2018 wurden zusätzlich 5 % Atlox 4913 hinzugefügt und der Anteil des gehärteten Rapsöls auf 50 % reduziert.

Aufgrund der hohen Trockenheit in den beiden Jahren trat in keiner der Versuchspartellen (einschließlich der unbehandelten Kontrolle) ein Befall mit Falschem Mehltau auf. Bezüglich der Wirksamkeit der Hopfenextrakt-Kapseln im realen Fall ließen sich deshalb keine Aussagen treffen. Mithilfe der Versuche konnte lediglich festgestellt werden, dass die Hopfenextrakt-Kapseln ohne Komplikationen mit praxisüblichen Feldspritzen ausgebracht werden können. Wichtig ist zudem, dass keine negativen Auswirkungen auf die Pflanzen – beispielsweise aufgrund der verkapselten Additive – beobachtet wurden. Hopfenextrakt kann also mithilfe der Mikroverkapselung in ein anwendbares Pflanzenschutzmittel ohne phytotoxische Nebenwirkungen verwandelt werden.

Die Validierung des Pflanzenschutzmittels im Freilandversuch ist einer der Gründe, warum selbst der Marktführer Bayer etwa zehn Jahre zur Entwicklung eines neuen Produkts einplant [4]. Umwelteinflüsse können dazu führen, dass im Versuchsfeld kein Befall vorliegt und kaum Erkenntnisse gewonnen werden können. Um dies zu vermeiden, sollten die

Versuche in mehreren Hopfengärten in verschiedenen Regionen durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Der Falsche Mehltau stellt die ökologische Landwirtschaft vor große Herausforderungen, weil noch keine umweltfreundlichen Pflanzenschutzmittel existieren. Seit Jahren wird nach Alternativen für die bisher eingesetzten kupferhaltigen Fungizide gesucht. Vielversprechend ist der Einsatz eines Extrakts aus Hopfendolden, dem eine fungizide Wirkung gegen die Schaderreger des Falschen Mehltaus im Labor nachgewiesen werden konnte. Der zähflüssige, lipophile Extrakt mit den oxidations- und lichtempfindlichen Wirkstoffen muss jedoch in eine anwendbare Form gebracht werden, um als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden zu können. Ziel dieser Forschungsarbeit war es, den Hopfenextrakt mithilfe der Mikroverkapselung in ein applizierbares und hochwirksames Produkt zu verwandeln, um seinen Einsatz zur Bekämpfung des Falschen Mehltaus im Hopfen zu ermöglichen. Zur Herstellung der Mikro kapseln wurde das Verfahren der Sprüherstarrung ausgewählt. Die betrachteten Produkteigenschaften waren die Partikelgröße, die Dispergierbarkeit und Suspensionsstabilität in Wasser, die Freisetzung und Stabilität der Wirkstoffe, die Retention und Regenfestigkeit der Partikeln auf hydrophober Oberfläche und die biologische Wirksamkeit.

Im ersten Schritt wurden mögliche Matrixmaterialien untersucht. Die Wirkstoffe blieben während der Produktion bei Verkapselung mit Fettsäuren und Triglyceriden stabil. Wachse hingegen eigneten sich nicht als Verkapselungsmaterial. Je höher der Schmelzpunkt des Lipids, desto fließfähiger waren die Pulver.

Um die Dispergierbarkeit und Suspensionsstabilität in Wasser der Lipidkapseln zu ermöglichen, wurden Emulgatoren integriert. Zusätzlich sollten sie durch ihre solubilisierende Wirkung für eine Freisetzung der Wirkstoffe sorgen. Die beste Benetzbarkeit konnte bei HLB-Werten über 11 erreicht werden. Die Suspensionsstabilität war nicht nur vom HLB-Wert, sondern auch von der chemischen Zusammensetzung des Emulgators abhängig. Je höher die Emulgatormenge in der Kapsel, desto stabiler war die Suspension und desto mehr Wirkstoff wurde aus der Kapsel gelöst. Die chemische Zusammensetzung eines Emulgators bestimmte, welche Wirkstoffe bevorzugt freigesetzt wurden. Durch die Kombination von verschiedenen Tensiden in der Kapsel konnten Mischmizellen mit neuen Eigenschaften erzeugt werden, wodurch alle Wirkstoffgruppen zu einem hohen Anteil aus der Kapsel gelöst werden konnten. Die beste Freisetzung

wurde mit einem Polyoxyethylen-(20)-Stearylether mit der Bezeichnung Brij S20 zusammen mit einem Zucker-Fettsäureester erreicht.

Zur Optimierung der Vereinzelnung der Partikeln in der Spritzbrühe wurden Dispergiermittel untersucht. Das beste Resultat konnte mit Atlox 4913 erreicht werden, welches Agglomerate unter Rühreintrag zu einem hohen Grad zerstören konnte. Zusätzlich besaßen die Kapseln eine erhöhte Suspensionsstabilität und Freisetzung von Xanthohumol.

Bezüglich der Stabilität der Wirkstoffe wurde festgestellt, dass die Verkapselung den Abbau nicht verhindern konnte. Die höchste Abbaurrate wurde bei Sauerstoffkontakt und Lichteinwirkung beobachtet. Durch den Zusatz von Antioxidantien gelang es, den Wirkstoffverlust zu minimieren. Die Kombination aus 0,5 % Tocopherol und 0,2 % Ascorbinsäure konnte den Extrakt am besten vor Oxidation schützen. Dennoch kam es durch Licht oder Wärme zur Isomerisierung der Humulone. Deshalb sollte das Pulver in lichtundurchlässigen, vakuumierten und gekühlten Behältern aufbewahrt werden.

DSC-Messungen wurden durchgeführt, um Veränderungen in der Kapselstruktur feststellen zu können. Es zeigte sich, dass emulgatorhaltige Lipidkapseln beim Herstellungsprozess in der thermodynamischen instabilen α -Form erstarrten. Innerhalb weniger Tage kam es zur Umkristallisation zur stabileren β' - und β -Konfiguration. In Verbindung mit dieser Umstrukturierung wurde eine geringere Freisetzung der Wirkstoffe gemessen. Veränderungen in Rießelfähigkeit und Dispergierbarkeit der Pulver konnten ebenfalls mithilfe der Struktur-analyse nachvollzogen werden.

Die Untersuchungen zur Retention der Kapseln auf hydrophober Oberfläche zeigten, dass der Zusatz von Emulgatoren sowohl positive als auch negative Auswirkungen hat. Zwar konnten nach dem Aufsprühen mehr Partikeln unabhängig vom Blattwinkel anhaften und es bildete sich eine homogenere Schicht, jedoch verschlechterte sich die Regenresistenz deutlich aufgrund der besseren Benetzbarkeit. Die untersuchten Haftmittel konnten die Regenstabilität nicht signifikant verbessern.

Die biologische Wirksamkeit wurde anhand von Blattscheibenversuchen bestimmt. Die Hopfenextrakt-Kapseln zeigten bereits ohne Emulgatoren, d.h. bei sehr geringer Wirkstofffreisetzung, eine fungizide Wirkung. Ab einer Dosis von 0,5 % Hopfenextrakt bezogen auf die Wassermenge im Spitzbehälter reichte der Kontakt der Kapseln mit dem Pathogen aus, um die Blätter vor einer Infektion zu schützen. Dennoch ist die Freisetzung der

Wirkstoffe hilfreich, wie aus dem Vergleich zwischen verschiedenen Matrixmaterialien hervorging. Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor ist die Verteilung der Kapseln auf dem Blatt. Um eine Infektion vollständig zu verhindern muss eine homogene Schicht erreicht werden. Bei Kapseln mit Adjuvanten konnten Wirkungsgrade von 100 % ab einer Hopfenextrakt-Konzentration von 0,125 % in der Spritzbrühe erzielt werden. Die benötigte Menge Hopfenextrakt entspricht damit nur einem Bruchteil des durchschnittlichen Ertrags der Hopfenwirkstoffe. Basierend auf den im Laufe dieser Forschungsarbeit gewonnenen Daten sollte die optimale Kapselrezeptur aus 49,3 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20, 15 % C-1616, 5 % Atlox 4913, 0,5 % Tocopherol und 0,2 % Ascorbinsäure bestehen.

Die durchgeführten Untersuchungen beweisen, dass Hopfenextrakt mithilfe der Mikroverkapselung in ein anwendbares und wirksames Pflanzenschutzmittel gewandelt werden kann. Durch die Verwendung von Tensiden konnte aus den Lipidpartikeln ein wasserdispergierbares Pulver hergestellt werden, das die lipophilen Wirkstoffe bei Kontakt mit Wasser freisetzt. Der Zusatz von Antioxidantien führte zu einer Stabilisierung der empfindlichen Hopfenstoffe. Die Blattscheibenversuche zeigten, dass die Hopfenextrakt-Kapseln grundsätzlich als Fungizid gegen den Falschen Mehltau verwendet werden können. Allerdings liefern die Laborversuche nur orientierende Ergebnisse für die tatsächliche Wirksamkeit des Pulvers im Freiland, da Einflussfaktoren wie Blatthaftung und Umwelteinflüsse nicht berücksichtigt werden können. Eine quantitative Aussage ist deshalb nur anhand von Freilandversuchen möglich. Während des Entwicklungszeitraumes wurden erste Versuche durchgeführt, die zwar die Anwendbarkeit der Hopfenextrakt-Kapseln belegten, aber wegen mangelnden Befalls keine weiteren Aussagen zuließen.

Aufgrund der vielversprechenden Versuche im Labor sind weitere Anwendungsversuche in Hopfengärten verschiedener Regionen mit den entwickelten Kapselprototypen geplant. Bereits in der Saison 2019 wurden weitere Versuche durchgeführt. Bewähren sich die Hopfenextrakt-Kapseln auch im Freiland, könnte mit dem Zulassungsverfahren begonnen werden, um sie in Zukunft als nachhaltige Kupferalternative einzusetzen.

6 Literaturverzeichnis

- [1] BRÜGGEMANN, J., MOSCHITZ, H. and KRÄMER, C. Landwirtschaft - quo vadis? *Texte Umweltbundesamt*. 2018, **94**(1), ISSN 1862-4359
- [2] Ökologischer Landbau [online]. *Umweltbundesamt*. [Zugriff am: 4 February 2019]. Verfügbar unter: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/land-forstwirtschaft/oekologischer-landbau#textpart-1>
- [3] WILBOIS, K.-P., KAUER, R., FADER, B., KIENZLE, J., HAUG, P., FRITZSCHE-MARTIN, A., DRESCHER, N., REINERS, E. and RÖHRING, P. Kupfer als Pflanzenschutzmittel unter besonderer Berücksichtigung des Ökologischen Landbaus. *Journal für Kulturpflanzen*. 2009, **61**(4), 140-152. ISSN 0027-7479
- [4] Entwicklung eines Pflanzenschutzmittels: Ein Prüfmaraathon für die Sicherheit [online]. *Bayer AG*. [Zugriff am: 22 August 2018]. Verfügbar unter: [https://www.cropscience.bayer.de/de-de/stories/2016/entwicklung-eines-pflanzenschutzmittels-ein-pruefmarathon-fuer-die-sicherheit](https://www.cropsscience.bayer.de/de-de/stories/2016/entwicklung-eines-pflanzenschutzmittels-ein-pruefmarathon-fuer-die-sicherheit)
- [5] *Humulus Lupulus*. ITIS [online]. *Integrated Taxonomic Information System on-line database*. [Zugriff am: 10 July 2018]. Verfügbar unter: https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19160#null
- [6] NARZISS, L. and BACK, W. *Die Bierbrauerei Band 2: Die Technologie der Würz Zubereitung*. 8. Auflage. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009, ISBN 978-3-527-32533-7
- [7] BARTH, H.J., KLINKE, C., and SCHMIDT, C. *Der grosse Hopfenatlas*. Nürnberg: Joh. Barth & Sohn, 1994, ISBN 3-418-00744-9
- [8] BEATSON, R.A., KENNY, S.T., PETHYBRIDGE, S.J., and GENT, D.H. Hop Production. In: MAHAFFEE, W.F., PETHYBRIDGE, S.J., and GENT, D.H. *Compendium of Hop Diseases and Pests*. Minnesota: The American Phytopathological Society, 2009, S. 5-8. ISBN 978-0-89054-376-4
- [9] ZANOLI, P. and ZAVATTI, M. Pharmacognostic and pharmacological profile of *Humulus lupulus* L. *Journal of Ethnopharmacology*. 2008, **116**(3), 383-396. ISSN 0378-8741

- [10] NARZISS, L. The German Beer Law. *Journal of the Institute of Brewing*. 1984, **90**(6), 351–358. ISSN 00469750
- [11] BIENDL, M. and PINZL, C. Hops and Health. *Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly*. 2009, **46**(2), 1–7.
- [12] GERHAUSER, C., ALT, A., HEISS, E., GAMAL-ELDEEN, A., KLIMO, K., KNAUFT, J., NEUMANN, I., SCHERF, H.-R., FRANK, N., BARTSCH, H. and BECKER, H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Molecular cancer therapeutics*. 2002, **1**(9), 959–969. ISSN 1535-7163
- [13] JONGTHAWIN, J., TECHASEN, A., LOILOME, W., YONGVANIT, P. and NAMWAT, N. Anti-inflammatory agents suppress the prostaglandin e2 production and migration ability of Cholangiocarcinoma cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2012, **13**(1), 47–51. ISSN 15137368
- [14] WEISKIRCHEN, R., MAHLI, A., WEISKIRCHEN, S. and HELLERBRAND, C. The hop constituent xanthohumol exhibits hepatoprotective effects and inhibits the activation of hepatic stellate cells at different levels. *Frontiers in physiology*. 2015, **6**(5), 140. ISSN 1664-042X
- [15] Humulus Lupulus Extract [online]. *Cosmetic ingredient database of the European Commission*. [Zugriff am: 13 July 2018]. Verfügbar unter: http://ec.europa.eu/growth/tools-databases/cosing/index.cfm?fuseaction=search.details_v2&id=83442
- [16] BORTOLUZZI, C., MENTEN, J.F.M., ROMANO, G.G., PEREIRA, R. and NAPTY, G.S. Effect of hops β -acids (*Humulus lupulus*) on performance and intestinal health of broiler chickens. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2014, **23**(3), 437–443.
- [17] YANAR, Y., GÖKÇE, A., KADIOĞLU, I., ÇAM, H. and WHALON, M. In vitro antifungal evaluation of various plant extracts against early blight disease (*Alternaria solani*) of potato. *African Journal of Biotechnology*. 2011, **10**(42), 8291–8295. ISSN 1684-5315
- [18] GÖKÇE, A., WHALON, M.E., ÇAM, H., YANAR, Y., DEMIRTAŞ, İ. and GÖREN, N. Contact and residual toxicities of 30 plant extracts to Colorado potato beetle larvae. *Archives Of Phytopathology And Plant Protection*. 2007, **40**(6), 441–450. ISSN 0323-5408
- [19] YANAR, Y., KADIOĞLU, I., GÖKÇE, A., DEMIRTAŞ, I., GÖREN, N.,

- ÇAM, H. and WHALON, M. In vitro antifungal activities of 26 plant extracts on mycelial growth of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *African Journal of Biotechnology*. 2011, **10**(14), 2625–2629.
- [20] WEITBRECHT, K., SCHMIDT, C., and KASSEMAYER, H.-H. Reduzierung kupferhaltiger Pflanzenschutzmittel im ökologischen Weinbau: Untersuchungen zu innovativen Kupferformulierungen mit hohem Reduktionspotential und Entwicklung von Strategien zu deren gezielter Anwendung gegen die Rebenperonospora [online]. *Organic eprints*. [Zugriff am: 13 July 2018]. Verfügbar unter: <http://www.orgprints.org/27036/>
- [21] FLESAR, J., HAVLIK, J., KLOUCEK, P., RADA, V., TITERA, D., BEDNAR, M., STROPNICKY, M. and KOKOSKA, L. In vitro growth-inhibitory effect of plant-derived extracts and compounds against *Paenibacillus* larvae and their acute oral toxicity to adult honey bees. *Veterinary Microbiology*. 2010, **145**(1–2), 129–133. ISSN 0378-1135
- [22] VERZELE, M. 100 Years Of Hop Chemistry And Its Relevance To Brewing. *Journal of the Institute of Brewing*. 1986, **92**(1), 32–48. ISSN 00469750
- [23] KRAMER, B., THIELMANN, J., HICKISCH, A., MURANYI, P., WUNDERLICH, J. and HAUSER, C. Antimicrobial activity of hop extracts against foodborne pathogens for meat applications. *Journal of Applied Microbiology*. 2015, **118**(3), 648–657. ISSN 13645072
- [24] SPETSIG, L.O. Electrolytic Constants and Solubilities of Humulonic Acid, Humulone, and Lupulone. *Acta Chemica Scandinavica*. 1955, **9**(1), 1421–1424.
- [25] KROFTA, K., VRABCOVÁ, S., MIKYSKA, A., JURKOVÁ, M., CAJKA, T. and HAJŠLOVÁ, J. Stability of Hop Beta Acids and Their Decomposition Products during Natural Ageing. *Acta Horticulturae*. 2013, (1010), 221–230.
- [26] KROFTA, K. and MIKYSKA, A. Hop beta acids: Properties, Significance and Utilization. *Kvasný průmysl*. 2014, **60**(4), 96–105.
- [27] STEVENS, J.F., TAYLOR, A.W., CLAWSON, J.E. and DEINZER, M.L. Fate of xanthohumol and related prenyl-flavonoids from hops to beer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1999, **47**(6), 2421–2428. ISSN 00218561
- [28] RÖMPP online: Eintrag zu Xanthohumol [online]. *Georg Thieme*

- Verlag KG. [Zugriff am: 30 July 2018]. Verfügbar unter: <https://roempp.thieme.de/roempp4.o/do/data/RD-24-00176?update=true>
- [29] WUNDERLICH, S., ZÜRCHER, A. and BACK, W. Enrichment of xanthohumol in the brewing process. *Molecular Nutrition & Food Research*. 2005, **49**(9), 874–881. ISSN 1613-4125
- [30] VAN CLEEMPUT, M., CATTOOR, K., DE BOSSCHER, K., HAEGEMAN, G., DE KEUKELEIRE, D. and HEYERICK, A. Hop (*Humulus lupulus*)-Derived Bitter Acids as Multipotent Bioactive Compounds. *Journal of Natural Products*. 2009, **72**(6), 1220–1230. ISSN 0163-3864
- [31] STOMPOR, M. and ŽAROWSKA, B. Antimicrobial Activity of Xanthohumol and Its Selected Structural Analogues. *Molecules*. 2016, **21**(5), 608. ISSN 1420-3049
- [32] SAKAMOTO, K. and KONINGS, W.N. Beer spoilage bacteria and hop resistance. *International Journal of Food Microbiology*. 2003, **89**(2–3), 105–124. ISSN 0168-1605
- [33] MIZOBUCHI, S. and SATO, Y. Antifungal Activities of Hop Bitter Resins and Related Compounds. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1985, **49**(2), 399–403. ISSN 0002-1369
- [34] MIZOBUCHI, S. and SATO, Y. A new flavanone with antifungal activity isolated from hops. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1984, **48**(11), 2771–2775. ISSN 0002-1369
- [35] SIMPSON, W.J. Studies on the sensitivity of lactic acid bacteria to hop bitter acids. *Journal of the Institute of Brewing*. 1993, **99**(5), 405–411. ISSN 00469750
- [36] SKOTLAND, C.B. and JOHNSON, D.A. Control of Downy Mildew of Hops. *Plant Disease*. 1983, **67**(1), 1183–1185.
- [37] JOHNSON, D.A., ENGELHARD, B., and GENT, D.H. Downy Mildew. In: MAHAFFEE, W.F., PETHYBRIDGE, S.J., and GENT, D.H. *Compendium of Hop Diseases and Pests*. Minnesota: The American Phytopathological Society, 2009, S. 18–22. ISBN 978-0-89054-376-4
- [38] KIRK, P.M. Species Fungorum (version Oct 2017) [online]. In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2018). *Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th*

- June 2018. [Zugriff am: 6 July 2018]. Verfügbar unter: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/c19821bdacf229f14f8ce35eb178577/synonym/f88c79abd09720c23941655a225503ff>
- [39] JUDELSON, H. Sexual Reproduction in Oomycetes: Biology, Diversity, and Contribution to Fitness. In: LAMOUR, K. and KAMOUN, S. *Oomycete Genetics and Genomics*. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2009, 121–138. ISBN 978-0-470-25567-4
- [40] ROYLE, D.J. and THOMAS, G.G. Factors affecting zoospore responses towards stomata in hop downy mildew (*Pseudoperonospora humuli*) including some comparisons with grapevine downy mildew (*Plasmopara viticola*). *Physiological Plant Pathology*. 1973, 3(3), 405–417. ISSN 00484059
- [41] Strategiepapier zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel unter besonderer Berücksichtigung des Ökologischen Landbaus [online]. *BÖLW e.V.* [Zugriff am: 21 August 2018]. Verfügbar unter: https://kupfer.julius-kuehn.de/dokumente/upload/80547_kupfer_strategiepapier_juli_2010.pdf
- [42] Strategiepapier zu Kupfer als Pflanzenschutzmittel unter besonderer Berücksichtigung des Ökologischen Landbaus: Aktueller Stand der Aktivitäten und weiterer Handlungsbedarf [online]. *BÖLW e.V.* [Zugriff am: 21 August 2018]. Verfügbar unter: https://kupfer.julius-kuehn.de/dokumente/upload/ff21d_160425_strategiepapier_kupfer_2.o_oktober_2015.pdf
- [43] Formulierungstypen von Pflanzenschutzmitteln [online]. *Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit*. [Zugriff am: 21 August 2018]. Verfügbar unter: https://www.bvl.bund.de/DE/04_Pflanzenschutzmittel/01_Aufgaben/08_Produktchemie/01_BeistoffeFormulierungschemie/01_Formulierungstypen/psm_BeistoffeFormulierungschemie_formulierungstypen_node.html
- [44] FAHR, A. and LIU, X. Expert Opinion on Drug Delivery Drug delivery strategies for poorly water-soluble drugs. 2007, ISSN 1742-5247
- [45] WÄRTGEN, K. Über den Einfluss äusserer Faktoren auf die Stabilität der Hopfenbitterstoffe. Dissertation, Philipps-Universität Marburg/Lahn, 1990
- [46] FAO/WHO *Manual on development and use of FAO and WHO*

- specifications for pesticides*. 1. Auflage. Geneva and Rome: WHO and FAO, 2016, ISBN 978-92-5-109265-1
- [47] DEGRANDI-HOFFMAN, G., AHUMADA, F., PROBASCO, G. and SCHANTZ, L. The effects of beta acids from hops (*Humulus lupulus*) on mortality of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Experimental and Applied Acarology*. 2012, **58**(4), 407–421. ISSN 0168-8162
- [48] MOLLET, H. and GRUBENMANN, A. *Formulierungstechnik*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2000, ISBN 9783527625703
- [49] A-Staub [online]. *Deutsche Gesetzliche Unfallversicherungen e.V.* [Zugriff am: 31 August 2018]. Verfügbar unter: <https://www.dguv.de/staub-info/was-ist-staub/a-staub/index.jsp>
- [50] MARKUS, A. and LINDER, C. Advances in the Technology for Controlled-Release Pesticide Formulations. In: BENITA, S. *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*. 2. Auflage. New York: Taylor & Francis, 2005, 55–76. ISBN 9780824723170
- [51] HACK, B., EGGER, H., UHLEMANN, J., HENRIET, M., WIRTH, W., VERMEER, A.W.P. and DUFF, D.G. Advanced Agrochemical Formulations through Encapsulation Strategies? *Chemie Ingenieur Technik*. 2012, **84**(3), 223–234. ISSN 0009286X
- [52] DASH, S., MURTHY, P. and NATH, L. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. 2010, **67**(3), 217–223. ISSN 0001-6837
- [53] GOUIN, S. Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*. 2004, **15**(7–8), 330–347. ISSN 09242244
- [54] I. RÉ, M. Microencapsulation by Spray Drying. *Drying Technology*. 1998, **16**(6), 1195–1236. ISSN 0737-3937
- [55] MILLER, D.A. and MARCO, G. Spray-Drying Technology. In: WILLIAMS III, R.O., WATTS, A.B., and MILLER, D.A. *Formulating Poorly Water Soluble Drugs*. 1. Auflage. New York: Springer, 2012, 363–442. ISBN 978-1-4899-8592-7
- [56] JYOTHI, S.S., SEETHADEVI, A., SURIA PRABHA, K., MUTHUPRASANNA, P. and PAVITRA, P. Microencapsulation: a review. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2012, **3**(1), 509–531. ISSN 0975-6299
- [57] WOZNIAK, G. *Zerstäubungstechnik - Prinzipien, Verfahren, Geräte*.

1. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003, ISBN 978-3-642-62509-1
- [58] LEFEBVRE, A.H. and MCDONELL, V.G. *Atomization and Sprays*. 2. Auflage. Boca Raton: CRC Press, 2017, ISBN 978-1-4987-3625-1
- [59] TURCK, E. Die Zweistoffdüse in der Zerstäubungstrocknung. *Chemie Ingenieur Technik*. 1953, **25**(10), 620–622.
- [60] KIYOMI OKURO, P., DE MATOS JUNIOR, F.E. and FAVARO-TRINDADE, C.S. Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. *Food Technology and Biotechnology*. 2013, **51**(2), 171–182.
- [61] HEDE, P.D., BACH, P. and JENSEN, A.D. Two-fluid spray atomisation and pneumatic nozzles for fluid bed coating/agglomeration purposes: A review. *Chemical Engineering Science*. 2008, **63**(14), 3821–3842. ISSN 0009-2509
- [62] TEUNOU, E., FITZPATRICK, J.. and SYNNOTT, E.. Characterisation of food powder flowability. *Journal of Food Engineering*. 1999, **39**(1), 31–37. ISSN 0260-8774
- [63] STIESS, M. *Mechanische Verfahrenstechnik - Partikel-technologie 1*. 3. Auflage. Berlin: Springer, 2009, ISBN 9783540325512
- [64] BELITZ, H.-D., GROSCH, W., and SCHIEBERLE, P. *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 6. Auflage. Berlin: Springer, 2008, ISBN 978-3-540-73201-3
- [65] PEMSEL, M. *Entwicklung und Qualifizierung von virusbeladenen Partikeln für den biologischen Pflanzenschutz im Apfelanbau*. 1. Auflage. Aachen: Shaker Verlag, 2015, ISBN 978-3-8440-3276-5
- [66] BONNET, M. *Kunststoffe in der Ingenieur Anwendung*. 1. Auflage. Wiesbaden: Vieweg+Teuber, 2009, ISBN 978-3-8348-0349-8
- [67] MASSINON, M. and LEBEAU, F. Review of physicochemical processes involved in agrochemical spray retention. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environment*. 2013, **17**(3), 494–504. ISSN 1370-6233
- [68] GÜLZ, P.-G., MÜLLER, E., HERRMANN, T. and LÖSEL, P. Epicuticular Leaf Waxes of the Hop (*Humulus lupulus*). Chemical Composition and Surface Structures. *Zeitschrift für Naturforschung C*. 1993, **48**(9–10), 689–696.

- [69] HAZEN, J.L. Adjuvants - Terminology, Classification, and Chemistry. *Weed Technology*. 2000, **14**(4), 773–784.
- [70] LAUTH, G.J. and KOWALCZYK, J. *Einführung in die Physik und Chemie der Grenzflächen und Kolloide*. 1. Auflage. Berlin: Springer, 2016, ISBN 978-3-662-47018-3
- [71] MÜLLER, B. and POTH, U. *Lackformulierung und Lack-rezeptur*. 4. Auflage. Hannover: Vincentz Network, 2017, ISBN 978-3-86630-616-5
- [72] SATO, K. Crystallization behaviour of fats and lipids — a review. *Chemical Engineering Science*. 2001, **56**(7), 2255–2265. ISSN 0009-2509
- [73] HÄNSEL, R. and STICHER, O. *Pharmakognosie Phyto-pharmazie*. 9. Auflage. Heidelberg: Springer-Verlag, 2010, ISBN 978-3-642-00962-4
- [74] GRASSI, M., GRASSI, G., LAPASIN, R., and COLOMBO, I. *Understanding drug release and absorption mechanisms : a physical and mathematical approach*. 1. Auflage. Boca Raton: CRC Press, 2007, ISBN 9780849330872
- [75] XU, R. *Particle Characterization: Light Scattering Methods*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2002, ISBN 0-306-47124-8
- [76] ISO 13320:2009 *Particle size analysis - Laser diffraction methods*.
- [77] MERKUS, H.G. *Particle Size Measurements*. 1. Auflage. Dordrecht: Springer Science+Business Media B.V., 2009, ISBN 978-1-4020-9015-8
- [78] DOBRAT, W. and MARTJIN, A. *CIPAC Handbook F*. 2012, ISBN 902951866
- [79] HARRIS, D.C. *Lehrbuch der Quantitativen Analyse*. 8. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2014, ISBN 978-3-642-37788-4
- [80] ENGELHARDT, H., BECK, W., KOHR, J. and SCHMITT, T. Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten. *Angewandte Chemie*. 1993, **105**(5), 659–680. ISSN 00448249
- [81] ENGELHARDT, H., BECK, W., and SCHMITT, T. *Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten*. Braunschweig: Vieweg, 1994, ISBN 3528065974
- [82] OTSUKA, K., TERABE, S. and ANDO, T. Electrokinetic chromato-

- graphy with micellar solutions : Separation of phenylthiohydantoin-amino acids. *Journal of Chromatography A*. 1985, **332**(1), 219–226. ISSN 0021-9673
- [83] HASEMANN, P.E. Leistungsfähigkeit von MEKC-Methoden und chiralen Trennungen mittels Kapillarelektrophorese. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig, 2011
- [84] SAVEYN, H., MERMUYS, D., THAS, O. and VAN DER MEEREN, P. Determination of the Refractive Index of Water-dispersible Granules for Use in Laser Diffraction Experiments. *Particle & Particle Systems Characterization*. 2002, **19**(6), 426–432. ISSN 09340866
- [85] HAYAKAWA, O., NAKAHIRA, K. and TSUBAKI, J.I. Estimation of the optimum refractive index by the laser diffraction and scattering method: On the raw material of fine ceramics. *Advanced Powder Technology*. 1995, **6**(1), 47–61. ISSN 0921-8831
- [86] MALVERN Selecting an appropriate particle absorption for laser diffraction particle size calculations. Technical Note 101104, Malvern Instruments Limited, 2016
- [87] HALLSTRÖM, B., GEKAS, V., SJÖHOLM, I., and ROMULUS, A.M. Mass Transfer in Foods. In: HELDMAN, D.R. and LUND, D.B. *Handbook of Food Engineering*. 2. Auflage. Boca Raton: CRC Press, 2007, 471–494. ISBN 978-0-8247-5331-3
- [88] MORGAN FOOD PRODUCTS, INC. Methods of encapsulating liquids in fatty matrices, and products thereof. USA, 5204029A, 1989
- [89] SCHWARTZ, H., OLLILAINEN, V., PIIRONEN, V. and LAMPI, A.-M. Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2008, **21**(2), 152–161. ISSN 0889-1575
- [90] CÂMARA GRILO, E., COSTA, P.N., SANTOS, C., GURGEL, S., FERNANDA DE LIMA BESERRA, A., NIÉCE DE SOUZA ALMEIDA, F. and DIMENSTEIN, R. Alpha-tocopherol and gamma-tocopherol concentration in vegetable oils. *Food Science and Technology*. 2014, **34**(2), 379–385. ISSN 0101-2061
- [91] AKOH, C.C. and NWOSU, C. V. Emulsification properties of polyesters and sucrose ester blends II: Alkyl glycoside polyesters. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 1992, **69**(1), 14–19. ISSN 0003-021X

- [92] PARTAL, P., GUERRERO, A., BERJANO, M. and GALLEGOS, C. Transient flow of o/w sucrose palmitate emulsions. *Journal of Food Engineering*. 1999, **41**(1), 33–41. ISSN 0260-8774
- [93] PARTAL, P., GUERRERO, A., BERJANO, M., MUÑOZ, J. and GALLEGOS, C. Flow Behaviour And Stability of Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Sucrose Palmitate. *Journal of Texture Studies*. 1994, **25**(3), 331–348. ISSN 0022-4901
- [94] TARRAS-WAHLBERG, N., ROSÉN, A., STENHAGEN, G., LARKÖ, O., WENNBERG, A.-M. and WENNERSTRÖM, O. Changes in Ultraviolet Absorption of Sunscreens After Ultraviolet Irradiation. *Journal of Investigative Dermatology*. 1999, **113**(4), 547–553. ISSN 0022-202X
- [95] EBERMANN, R. and ELMADFA, I. *Lehrbuch Lebensmittel-chemie und Ernährung*. 1. Auflage. Wien: Springer-Verlag, 2008, ISBN 978-3-211-48649-8
- [96] FRICK, A. and STERN, C. *DSC-Prüfung in der Anwendung*. 2. Auflage. München: Carl Hanser Verlag, 2013, ISBN 978-3-446-43690-9
- [97] GEHRING, K. Zusatzstoffe zu Herbiziden: Wundermittel oder Placebos? *top agrar*. 2003, **1**(3), 78–84.
- [98] Der Barth-Bericht: Hopfen 2017/2018 [online]. *Joh. Barth & Sohn GmbH & Co KG*. [Zugriff am: 5 April 2019]. Verfügbar unter: https://www.barthhaasgroup.com/de/component/cck/?task=download&collection=media_download_files&xi=o&file=fileupload_pdf_download&id=335

7 Anhang

Tabelle 13: Übersicht über den Ablauf des *pre-* und *post-conditionings* sowie des Reinigungsprogramms

Vorgang	Ablauf
<i>Preconditioning</i>	5 min Puffer
<i>Postconditioning</i>	5 min Methanol
	5 min VE-Wasser
	5 min 0,1 M NaOH _{aq}
	5 min VE-Wasser
	5 min 0,1 M HCl _{aq}
	5 min VE-Wasser
	5 min Puffer
Reinigungsprogramm	15 min 1 M NaOH _{aq}
	10 min VE-Wasser
	15 min 1 M HCl _{aq}
	10 min VE-Wasser
	15 min Puffer

Tabelle 14: Messparameter zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung mittels Mastersizer 2000

Parameter	Einstellung
<i>Refractive index</i>	1,775
<i>Absorption</i>	0,1
<i>Dispersant name</i>	Water
<i>Refractive index</i>	1,33
<i>Sample measurement time</i>	20 s

7 Anhang

Background measurement time	20 s
Lower obscuration limit	5 %
Upper obscuration limit	12 %
Measurement cycles	20-150, abhängig von Versuch
Delay between measurements	3 s
Rührerdrehzahl	2500 min ⁻¹
Ultraschall	10 %, Verwendung abhängig von Versuch

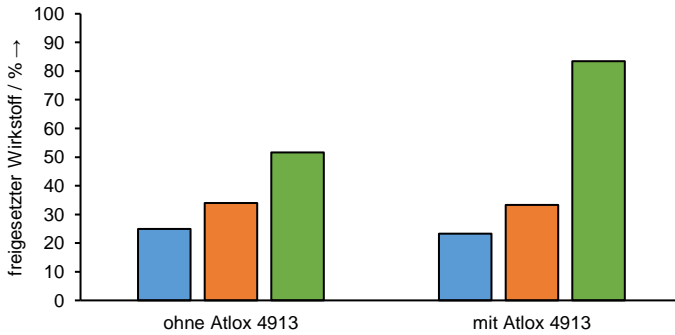


Abbildung 61: Vergleich der Wirkstofffreisetzung von Hopfenextrakt-Kapseln ohne und mit dem Dispergiertmittel Atlox 4913: Lupulone ■, Humulone ■ und Xanthohumul ■

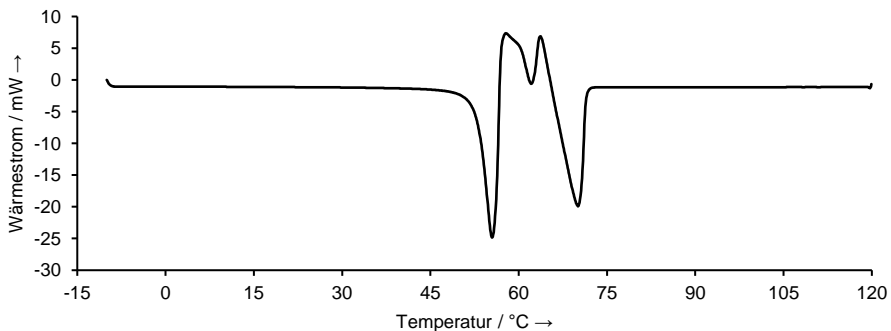


Abbildung 62: Verlauf der ersten Aufheizphase während der DSC-Analyse von gehärtetem Rapsöl 30 Tage nach der ersten Analyse.

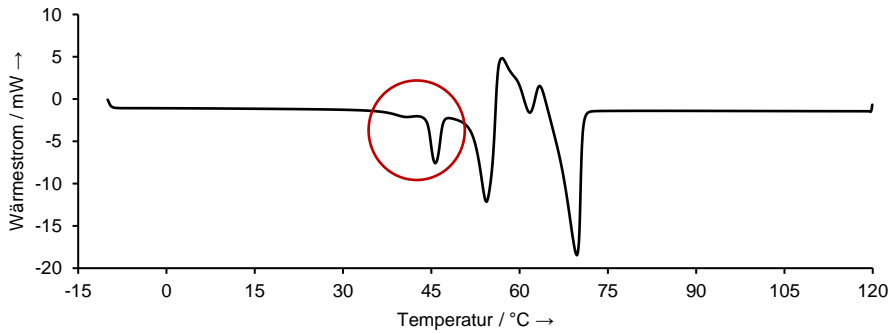


Abbildung 63: Verlauf der ersten Aufheizphase während der DSC-Analyse von Kapseln, die zuvor in Wasser suspendiert wurden. Die rote Markierung zeigt den Peak eines Emulgators, dessen untere Grenze aufgrund des gebundenen Wassers zu niedrigeren Temperaturen verzerrt ist

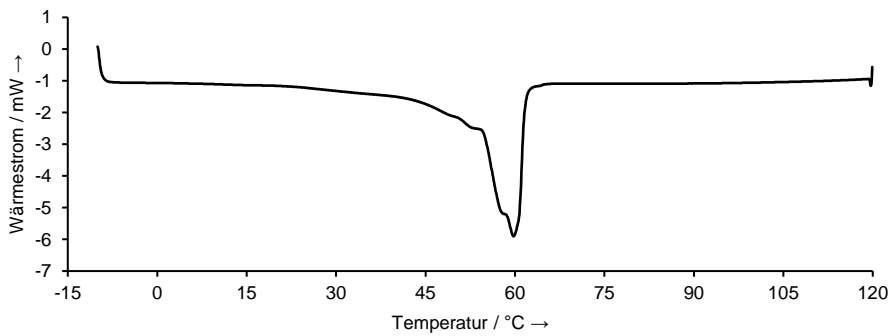


Abbildung 64: Verlauf der ersten Aufheizphase während der DSC-Analyse von Kapseln mit 35 % gehärtetem Rapsöl, 15 % Hopfenextrakt, 15 % Brij S20, 15 % C-1616 und 20 % Softenol 3995

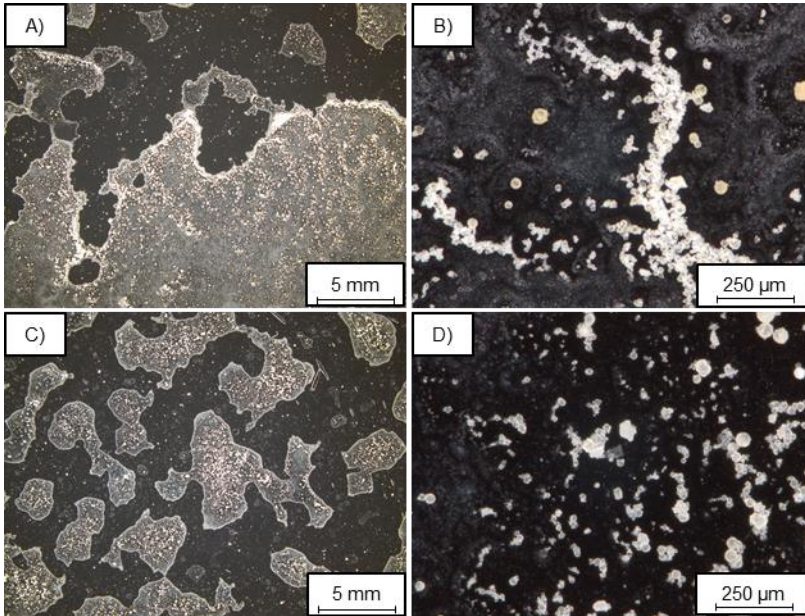


Abbildung 65: Mit Kapselsuspension beschichtete Platten in siebenfacher (links) und 115-facher Vergrößerung. A) und B) Kapseln mit 30 %-iger Wirkstoffbeladung, C) und D) Kapseln mit 15 %-iger Wirkstoffbeladung

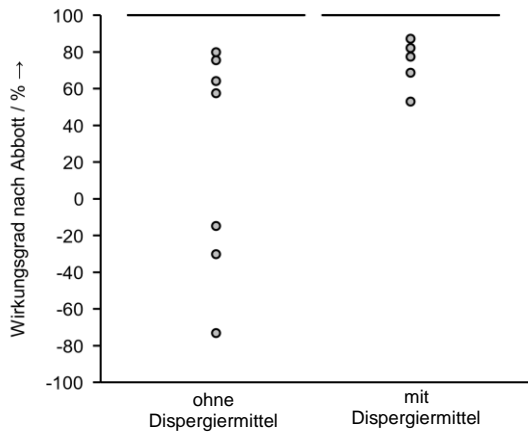


Abbildung 66: Wirkungsgrad nach Abbott von Hopfenextrakt-Kapseln ohne und mit dem Dispergiemittel Atlox 4913 im Blattscheibenversuch

Der Falsche Mehltau bedroht den ökologischen Anbau verschiedener Kulturen, wie Wein, Hopfen und einiger Obst- und Gemüsesorten. Zur Bekämpfung der Pflanzenkrankheit wurde bisher auf kupferhaltige Fungizide zurückgegriffen. Aufgrund der Anreicherung des Schwermetalls im Boden und seiner negativen Auswirkungen auf Vögel, Kleinsäuger und Regenwürmer fordert die Europäische Union eine Reduktion und zieht sogar ein Verbot in Betracht, sobald eine umweltfreundliche Alternative zur Verfügung steht. Damit weiterhin eine ökologische Produktion möglich bleibt, mussten neue wirksame Substanzen gefunden werden. Auf der Suche nach Alternativen konnte einem Extrakt aus den Dolden des Hopfens eine fungizide Wirkung gegen den Falschen Mehltau nachgewiesen werden. Damit der hochviskose, schlecht wasserlösliche und instabile Extrakt als Pflanzenschutzmittel eingesetzt werden kann, müssen die Produkteigenschaften an die Anwendung angepasst werden.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde die Mikroverkapselung als Formulierungsmethode gewählt, um den Hopfenextrakt in ein anwendbares und wirksames Pulver zu verwandeln, das einen möglichst lange anhaltenden Schutz bieten soll. Mithilfe der Sprüherstarrung wurden die Wirkstoffe in Lipid-Matrixkapseln eingebaut. Additive, wie Emulgatoren, Dispergiermittel und Antioxidantien, wurden verwendet, um die Kapseleigenschaften für die Anforderungen im Pflanzenschutz zu optimieren. Anhand von Blattscheibenversuchen konnte gezeigt werden, dass die entwickelten Kapselprototypen eine Infektion mit dem Schaderreger verhindern können. Die Untersuchungen lieferten den Beleg, dass mithilfe der Mikroverkapselung ein vielversprechendes biologisches Pflanzenschutzmittel aus dem Hopfenextrakt entwickelt wurde, welches in Zukunft Kupfer ersetzen könnte.

