

Neuartige Hopfenextrakte für die Neuroregeneration (NeHoReg)

Aktenzeichen G2/N/19/06

Endbericht

Laufzeit des Projekts: 01.10.2019 – 31.12.2022

Gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten

Bayerisches Staatsministerium für
Ernährung, Landwirtschaft und Forsten



Projektteam:

Miriam Wolf, M.A.
Theresa Bayerl, M.Sc.
Philipp Strobel, M.Sc.
Dr. Veronika Huber
Dr. Agnes Emberger-Klein
Johannes Buchner, M.A.

TP-Leiter:

Prof. Dr. Herbert Riepl
Professur Organisch-Analytische Chemie
Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
TUM Campus Straubing

Prof. Dr. Klaus Menrad
Professur Marketing und Management Nachwachsender Rohstoffe
Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
TUM Campus Straubing

Dr. rer. nat. Corinna Urmann
Professur Organisch-Analytische Chemie
Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
TUM Campus Straubing



Straubing, Januar 2023

Die Inhalte der vorliegenden Arbeit beziehen sich in gleichem Maße auf Frauen und Männer. Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird jedoch die männliche Form (Verbraucher, Kunde etc.) für alle Personenbezeichnungen gewählt. Die weibliche Form wird dabei stets mitgedacht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abkürzungsverzeichnis.....	3
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	8
1 Kurzbeschreibung.....	9
2 Einleitung und Zielsetzung	13
3 Stand des Wissens.....	18
3.1 Pflanzliche Arzneimittel und der Markt für pflanzliche Arzneimittel	18
3.2 Hopfen und Vorarbeiten zu Hopfen in der Phytomedizin.....	19
3.3 Nutzung von pflanzlichen Arzneimitteln und anderen natürlichen Gesundheitsprodukten, Zielgruppen und Produktattribute.....	21
4 Vorgehen, Ergebnisse und Diskussion	23
4.1 Arbeitspaket 1	23
4.1.1 Synthese der Referenzsubstanzen	23
4.1.2 Erstellung der analytischen Methoden	26
4.1.3 Extraktion und Versuche mit dem Hopfentreber	27
4.2 Arbeitspaket 2: Parameteranpassung.....	33
4.2.1 Bestimmung des Einflusses auf die Zellviabilität der Referenzsubstanzen	36
4.2.2 Untersuchung der Schutzwirkung auf Degenerationseinflüsse der Referenzsubstanzen und Extrakte.....	41
4.3 Arbeitspaket 4: Produktattribute und Zielgruppen	55
4.3.1 Verbraucheransprüche und Produktkonzepte <i>Vorgehen</i>	55
4.3.2 Ergebnisse und Diskussion	57
4.4 Arbeitspaket 5: Vermarktungstest.....	66
4.4.1 CBC-Experiment.....	68
4.4.2 Ergebnisse des CBC-Experiments.....	70
4.4.3 Ergänzende Ergebnisse: Zulassungsform und Vitamin-B-Zusatz.....	76
4.4.4 Validierung des Produktkonzepts via weiterer Online-Umfrage.....	77
5 Fazit und Ausblick	83
6 Handlungsempfehlungen für die Politik.....	85
7 Literaturverzeichnis	87

Abkürzungsverzeichnis

8FN	8-Farnesylnaringenin
8GN	8-Geranylningenin
8PN	8-Prenylningenin
AMG	Arzneimittelgesetz
APSA	Attention and Performance Self-Assessment
BMEL	Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft
CHP	Cumolhydroperoxid
CPF	chromanoiden Prenylflavonoide
DC	Dünnschichtchromatographie
DDQ	2,3-Dichlor-5,6-dicyano-1,4-benzochinon
DIA	Differenzierungs-auslösende Aktivität
DMSO	Dimethylsulfoxid
EMA	European Medicines Agency
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HSWT	Hochschule Weihenstephan-Triesdorf
IC ₅₀	halbmaximale zytotoxische Konzentration
LOD	Limit of Detection, Detektionsgrenze
LOQ	Limit of Quantification, Bestimmungsgrenze
ICH	International Conference on Harmonisation
MEC	Means-End-Chain
MeOH	Methanol
N	Naringenin
NAC	N-Acetylcystein
NHP	natürliches Gesundheitsprodukt (aus dem Englischen für natural health product)
NHPCC	natürliches Gesundheitsprodukt zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung (aus dem Englischen für natural health product for cognition and concentration)
NOS	reaktive Stickstoff-Spezies
NRA	normierter Renilla-Werte

OAC	Organisch-analytische Chemie
OTC	over the counter
PA	Polyamid
PAM	pflanzliche Arzneimittel
PK	Positivkontrolle
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RA	Retinolsäure
Rf	Retentionsfaktor
ROS	reaktive Sauerstoff Spezies
SNP	Natrium Nitroprusside
SR	Überlebensrate
SSVS	Short Schwartz Value Survey
Stk.	Stück
T	Treatment Kontrolle mit der schädigenden Substanz des jeweilig verwendeten Assays
VC	Ascorbinsäure
XA	Xanthohumol A
XC	Xanthohumol C
XN	Xanthohumol

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Schematische Darstellung des Cyclodextrin-unterstützten Filtrationsverfahrens. Links: Laboraufbau unterschiedliche Schichten sichtbar. Rechts: Filtertrockner für Upscaling und Standardisierung.....	20
Abbildung 2.	Umwandlung Xanthohumol in Xanthohumol A.....	23
Abbildung 3.	Relevante Inhaltsstoffe der Treber.....	24
Abbildung 4.	Synthese von 8-Farnesylnaringenin.....	26
Abbildung 5.	Kalibriergeraden der Flavonoide gemessen bei $\lambda = 370$ nm (Xanthohumol, Xanthohumol A) bzw. $\lambda = 290$ nm (Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A).....	27
Abbildung 6.	Berechnete Wirkungsfläche.....	28
Abbildung 7.	Extraktionen mit Methanol-Wasser bzw. Ethanol-Wasser-Gemischen.....	30
Abbildung 8.	Ermittlung des maximalen Verhältnisses von Treber zu Lösungsmittel.....	30
Abbildung 9.	Einfluss der Zeit auf die Menge an extrahierbarem Xanthohumol.....	31
Abbildung 10.	Einfluss der Temperatur auf die Extraktionsmenge an Xanthohumol.....	31
Abbildung 11.	Übersicht über die Versuche mit Treber und Extrakt.....	32
Abbildung 12.	Umsetzung der Treber mit Ameisensäure (100 %) in der Mikrowelle und anschließender Extraktion des Rückstandes mit EtOH:H ₂ O (80:20) im Vergleich zur Umsetzung der Treberextrakte.....	32
Abbildung 13.	Strukturen von Xanthohumol C und Xanthohumol A.....	33
Abbildung 14.	Konzentrationsabhängige R _f -Werte nach Substanzen nach TLC mit HP- β -Cyclodextrin als mobile Phase.....	34
Abbildung 16.	% (w/w) der Substanzen Xanthohumol (XN), Xanthohumol A (XA), Isoxanthohumol (IX) und Isoxanthohumol A (IXA) in den unterschiedlichen HP- β -Cyclodextrin Fraktionen.....	35
Abbildung 17.	Chemische Struktur eines Chalkons und Flavanons am Beispiel Xanthohumol C und Isoxanthohumol C. Der Ringschluss ist mit rotem Kreis angedeutet.....	36
Abbildung 18.	(A) Zytotoxizität unterschiedlicher Konzentrationen CoCl ₂ auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (B) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen CoCl ₂ induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	42
Abbildung 19.	Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B) und Xanthohumol A (C) sowie Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen CoCl ₂ induzierte Hypoxie. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 1 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 177 μ M CoCl ₂ behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	42
Abbildung 20.	Neuroprotektiver Effekt von 6- und 8-Prenylnaringenin (A; B) gegen CoCl ₂ induzierte Hypoxie. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 1 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 177 μ M CoCl ₂ behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	43
Abbildung 21.	(A) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen H ₂ O ₂ auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (B) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen H ₂ O ₂ induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	44

Abbildung 22.	(A) Chemische Struktur von Cumolhydroperoxid (CHP). (B) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen CHP auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (C) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen CHP induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	44
Abbildung 23.	Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B), und Xanthohumol A (C), sowie von Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen CHP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 2 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 21 µM CHP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).	45
Abbildung 24.	Neuroprotektiver Effekt von Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A gegen CHP induzierten oxidativen Stress. Werte wurden mit der Treatment-Kontrolle T (nur CHP behandelte Zellen) normiert; (n=3).....	45
Abbildung 25.	Neuroprotektiver Effekt der prenylierten Flavonoide 8-Prenylaringenin (A), 8-Geranylaringenin (B) und 8-Farnesylaringenin (C) gegen CHP induzierten oxidativen Stress; (n=3).	46
Abbildung 26.	(A) Chemische Struktur von Natrium Nitroprusside (SNP). (B) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen SNP auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (C) Neuroprotektiver Effekt von Vitamin C gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).	46
Abbildung 27.	Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B), und Xanthohumol A (C), sowie von Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 0,1 mM Ascorbinsäure (VC) als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 1,91 mM SNP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).....	47
Abbildung 28.	Neuroprotektiver Effekt von 8-Prenylaringenin (A), 8-Geranylaringenin (B) und 8-Farnesylaringenin (C) gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 0,1 mM Ascorbinsäure (VC) als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 1,91 mM SNP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).	48
Abbildung 29.	(A) Chemische Strukturen der prenylierten Flavanone. (B) Normierter neuroprotektiver Effekts gegen SNP induzierten oxidativen Stress von 8PN, 8GN und 8FN durch Verlängerung der Prenylseitenkette; (n=3).....	48
Abbildung 30.	Screening des neuroprotektiven Effekts der unterschiedlichen Rohextrakte aus dem Hopfentreber gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).....	49
Abbildung 31.	Screening des neuroprotektiven Effekts der Hopfenextrakte direkt aus dem Hopfentreber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ=mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).	50
Abbildung 32.	Screening des neuroprotektiven Effekts der Hopfenextrakte direkt aus dem Hopfentreber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ=mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).	50

Abbildung 33.	Screening des neuroprotektiven Effekts der unterschiedlichen Hopfenextrakte aus dem mit Säure behandelten Hopfentreber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ= mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).	51
Abbildung 34.	Reaktionsschema zur Umwandlung von Luciferin in das lumineszierende Oxyluciferin mittels der enzymatischen Katalyse durch die Ultra-Glo Luciferase.	51
Abbildung 35.	Effekt der Extrakte auf die Katalyseaktivität der Ultra-Glo Luciferase. (A) Inhibierender Effekt auf die Luciferaseaktivität. (B) Leistungssteigernder Effekt auf die Luciferaseaktivität; (n=3).....	52
Abbildung 36.	Screening der unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte ohne Zucker (A; C) und mit Zucker (B; D) auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) (c = 22 µg/mL); (n = 2).	53
Abbildung 37.	Screening der unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte ohne Zucker (A; C) und mit Zucker (B; D), die jeweils mit Ameisensäure umgesetzt worden sind, auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) (c = 22 µg/mL); (n = 2).	54
Abbildung 38.	Screening der unterschiedlichen Fraktionen des mit Ameisensäure umgesetzten Trebers (A; C) und des Treberextrakts aus dem Rückstand (B; D), auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) (c = 22 µg/mL); (n = 2).	55
Abbildung 39.	Offenheit gegenüber neuen NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakt (n=26).	60
Abbildung 40.	Produktkonzepte für A) ein pflanzliches Arzneimittel in Tablettenform; B) ein Nahrungsergänzungsmittel in Drageeform; C) ein pflanzliches Arzneimittel in Tropfenform (Werner, 2021).	60
Abbildung 41.	Layout des CBC-Experiments.	69
Abbildung 42.	Mittlere Wichtigkeiten der Produktattribute im Auswahlexperiment (in %), n=1584, nach Werner 2022.	71
Abbildung 43.	Durchschnittliche Nutzenwerte der einzelnen Produktattribut-Ausprägungen (Cero-zentrierter Diffs) (Werner 2022).	72
Abbildung 44.	Motive, warum Personen aus Gruppe 2 (n=118) und Gruppe 5 (n=390) NHP verwenden bzw. bereit sind zu verwenden.	76
Abbildung 45.	Einleitungstext, wie ihn die Probanden in der Online-Umfrage gesehen haben (n=1819).	78
Abbildung 46.	Bevorzugter Geschmack (n=1819).	79
Abbildung 47.	Ausgabebereitschaft für das Produkt in einer Verpackung mit einem Inhalt von 100 Dragees (n=1819).	79
Abbildung 48.	Bevorzugte Verpackungsart (n=1819).	80
Abbildung 49.	Orte, an denen Konsumenten das Produkt erwerben wollen würden (n=1819), Mehrfachnennung möglich.	81
Abbildung 50.	Antworten auf die Frage: Können Sie sich vorstellen, ein solches Produkt einzunehmen? (n=1819), Mehrfachnennung möglich.	81
Abbildung 51.	Von Teilnehmenden gewünschte weitere Informationen zu dem Produkt (n=1819); Mehrfachnennung möglich.	82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Einstellungen des Gradienten für die Analyse mit der Kinetex C18 Säule. Als Laufmittel dienten Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B).	26
Tabelle 2.	Nachweis, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-Methode.....	27
Tabelle 3.	Grenzen des Vollfaktor-Versuchsplans.	28
Tabelle 4.	Vergleich von berechnetem und gemessenem Optimum der Umwandlungsreaktion.	29
Tabelle 5.	Effekte von Xanthohumol, Xanthohumol A, und Xanthohumol C auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).	37
Tabelle 6.	Effekte von Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A, und Isoxanthohumol C auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).	38
Tabelle 7.	Effekte von 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).....	40
Tabelle 8.	Ergebnisse aus dem Attributranking, Relevanz der Attribute für den Konsum von NHP mit bekannten und mit unbekanntem Pflanzenextrakten im Vergleich (n=26). ...	58
Tabelle 9.	Produktkonzepte auf Basis der aus den Interviews gewonnenen Erkenntnisse zu den Verbraucheransprüchen an ein neuartiges NHPCC (nach Werner, 2021).	62
Tabelle 10.	Soziodemographische Verteilung der Befragten hinsichtlich ihrer Nutzung von NHP, n=1707.	67
Tabelle 11.	Wohnortverteilung der Teilnehmenden der ersten Onlinestudie in Abhängigkeit von deren NHP-Nutzung.....	68
Tabelle 12.	Untersuchte Produkteigenschaften und ihre Ausprägungen (angelehnt an Werner 2022).	70
Tabelle 13.	Marktsegmentierung, mittlere Wichtigkeiten der Produktattribute und Nutzenwerte der Attributausprägungen innerhalb von 6 Gruppen, n=1587 (Werner 2022).....	73
Tabelle 14.	Charakteristika der beiden möglichen Zielgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 5), n=508.	75
Tabelle 15.	Soziodemographische Daten der Teilnehmenden aus der zweiten Online-Umfrage.	77

1 Kurzbeschreibung

Pflanzliche Quellen für Arzneimittel stellen wider allen Anschein die Mehrheit der Rohprodukte für Pharmazeutika dar. Das kommt daher, dass viele nicht nur mittels Raffinations- und Extraktionsmethoden zu den zulassungspflichtigen (Phyto)-Arzneimitteln verarbeitet werden, sondern auch als Massenprodukte mit „Standardzulassung“ vermarktet werden, als einfache Teemischungen oder ähnliches zur Selbstmedikation dienen. Einige Beobachtungen der letzten Dekaden zeigen jedoch, dass ihr Einfluss besonders in einer langfristigen Anwendung liegen kann, und legen nahe, dass ihnen als Präventivmaßnahme zur Gesunderhaltung besondere Bedeutung zukommt. Während der Einsatz pflanzenbasierter Präparate bei koronaren Herzerkrankungen und ihrer Prävention mittlerweile gut etabliert ist, gilt das weniger für eine weitere Volkskrankheit, die neurodegenerativen Erkrankungen.

Das Auftreten von neurodegenerativen Erkrankungen ist eng mit dem fortschreitenden Alter gekoppelt, so dass sich neben dem medizinischen Aspekt auch vielfältige Auswirkungen auf das tägliche Leben der Betroffenen ergeben. Die sich derzeit auf dem Markt befindenden Präparate zur Behandlung von Erkrankungen wie Alzheimer oder Parkinson dienen der Symptombekämpfung und können die Krankheit an sich nicht aufhalten oder präventiv dagegenwirken. Neuartige Therapieansätze zielen auf die Aktivierung der Regeneration des betroffenen Areals im Gehirn durch die Verabreichung spezieller Substanzen ab. Diese Regeneration geht von einer Stammzellschicht aus, welche durch Differenzierung neue Neuronen hervorbringen kann. Diese Fähigkeit ist im Menschen in geringem Maße bis ins hohe Alter vorhanden, bedarf allerdings eines Anstoßes.

Einige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe des Hopfens weisen *in vitro* interessante Effekte bzgl. der Regeneration und Neubildung von Nervenzellen auf und eignen sich somit möglicherweise für einen Einsatz in der regenerativen Medizin. Die chromanoiden Prenylflavonoide („CPFs“) weisen die seltene Fähigkeit auf, Differenzierung aus der neuronalen adulten Stammzellen-Population einzuleiten. Diese Erkenntnisse wurden in einer Patentanmeldung zusammengefasst. Daneben wurde ein speziell auf diese Substanzen zugeschnittenes Cyclodextrin-unterstütztes Extraktionsverfahren entwickelt und zum Patent angemeldet, um die Wirkung in Phytopharmaka für mehr Patientinnen und Patienten zugänglich zu machen.

Auf der Grundlage der genannten Vorarbeiten war es dementsprechend das Fernziel dieses Projekts, auf der Basis der bisherigen Arbeiten ein neues Produkt im Bereich der Phytopharmaka zu entwickeln und damit einen erweiterten Absatzmarkt für Hopfen-verarbeitende Betriebe in Bayern zu schaffen. Damit dies gelingen konnte, musste zum einen ein standardisierter und charakterisierter Spezialextrakt angereichert mit aktiven Komponenten aus Hopfen gewonnen und zum anderen ein Produktkonzept für ein darauf basierendes Phytopharma-Produkt entwickelt werden. Um vor diesem Hintergrund das o.g. Fernziel zu erreichen, wurden im Projekt die folgenden Teilziele verfolgt:

1) Erhöhung des Gehalts an aktiven Komponenten über eine katalytische Umsetzung wenig aktiver Flavonoide:

Die für eine neuroprotektive Wirkung wertgebenden Inhaltsstoffe sind in Hopfen und dem Reststoff aus den Hopfen-verarbeitenden Betrieben (Treber) nicht in hohen Konzentrationen vorhanden. Jedoch haben Vorversuche ergeben, dass die Konzentration der interessierenden Inhaltsstoffe durch katalytische Umwandlung gesteigert werden kann. Ziel dieses Projektteils war es somit, diejenigen Parameter abzuleiten, die zu einer ausreichenden Umwandlung der interessierenden Inhaltsstoffe unter Berücksichtigung verfahrensrelevanter Parameter und eines günstigen Preis-Leistungs-Verhältnisses führen.

2) Anpassung der Extraktionsparameter an den neu hergestellten Edukt-Extrakt:

Wie im Patent der Antragsteller dargelegt, ist die Extraktion der wertgebenden Inhaltsstoffe grundsätzlich möglich. Durch die katalytische Umsetzung bildet sich jedoch ein Produkt, das nicht direkt im Extraktionsprozess verwendbar ist und dessen Verhalten im Prozess im Vergleich zum Edukt bewertet werden muss. Somit war es Ziel dieses Projektteils, mögliche Vorbehandlungen und die katalytische Umsetzung zu evaluieren. Zudem wurde untersucht, inwieweit einzelne Parameter des Verfahrens eine Anpassung an das Reaktions-Produkt bedürfen.

3) Bestimmung des Effektes von Referenzsubstanzen und Extrakten bezüglich der Neuroprotektion und Neuroregeneration:

Der Herstellungsprozess pflanzlicher Arzneiprodukte beeinflusst deren Wirkung entscheidend. Somit ist es notwendig, die verfahrenstechnischen Parameter eng gekoppelt mit den Untersuchungen zur biologischen Aktivität zu bestimmen. Ein weiteres Projektziel war es daher, das Potential weiterer Referenzsubstanzen und hergestellter Extrakte auf die Protektion und Regeneration von Nervenzellen in zellbiologischen Modellen abzuleiten.

Wie oben beschrieben sollte in diesem Projekt zudem ein Produktkonzept für ein solches Phytopharmazeutikum entwickelt und getestet werden, das dem frühen Entwicklungsstadium und den inhärenten Risiken Rechnung trägt. Eigene Vorarbeiten an der HSWT zeigen hohes Interesse von Verbrauchern an und damit verbunden eine starke Nutzung von pflanzlichen Arzneimitteln in Deutschland (Welz et al. 2019a). Zudem ist Hopfen als Arzneimittelpflanze bei Anwendern bekannt und wird insbesondere für seine schlaffördernden Wirkungen geschätzt (Riepl et al. 2018). Allerdings bestehen bislang noch keine Erkenntnisse darüber, wie Verbraucher und Patienten auf Hopfen als Basis für Neuroregeneration reagieren und wie erfolgversprechende Produktkonzepte in diesem Feld aussehen könnten. Daher bestanden im Produktentwicklungsteil dieses Projekts die folgenden Teilziele:

4) Entwicklung eines Produktkonzeptes für ein pflanzliches Arzneimittel auf Hopfenbasis im Bereich der Neuroregeneration

5) Ableitung der möglichen Zielgruppe und Testung des Verbraucherinteresses an dem entwickelten Produktkonzept

6) Überprüfung der Marktgängigkeit des entwickelten Produktkonzeptes mit Marktsimulationstest

Im Arbeitspaket 1 wurde nach Synthese der Referenzsubstanzen und Validierung der Methode zur chemischen Analyse, die säurekatalytische Umwandlung von Xanthohumol zu Xanthohumol A mittels statistischer Versuchsplanung optimiert. Das ermittelte Optimum (50 % Essigsäure, Reaktionstemperatur von 150°C und Reaktionszeit von 24 Stunden) ließ sich nicht direkt auf die Treber übertragen, da ein hoher Gehalt an Produkt im Treber verblieb. Folglich wurden die Parameter zur Treberextraktion untersucht. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Extraktion mit einem Gemisch aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 80 zu 20, bei Raumtemperatur und einer Dauer von 15 Minuten durchgeführt werden kann. Im Anschluss wurden unterschiedliche katalytische Umwandlungen durchgeführt, welche das Ziel hatten, mittels unterschiedlicher Vorbehandlung oder Extraktionsbedingungen den Gehalt des neuroprotektiven Xanthohumol A ausgehend von der Umwandlung von Xanthohumol im Treber oder Extrakt zu steigern. Die Umsetzungen von Extrakten mit Essigsäure lieferten grundsätzlich höhere Gehalte an Isoxanthohumol A. Diese Pyranoflavanone weisen eine höhere Differenzierungsinduktion als prenylierte Flavone auf, allerdings ist sie wesentlich geringer als bei Xanthohumol A. Anders verhielt es sich bei Anwendung von Ameisensäure, welche zu höheren Anteilen Xanthohumol A führte.

Im Arbeitspaket 2 zeigte die Untersuchungen von Xanthohumol A im Modellsystem der Dünnschichtchromatographie, dass für das Cyclodextrin-unterstützte Extraktionsverfahren keine

Parameteranpassung notwendig war. Allerdings konnten für Xanthohumol C im Vergleich zu Xanthohumol A geringere Cyclodextrinkonzentrationen angewandt werden. Die unterschiedlich hergestellten Extrakte wurden mit dem Cyclodextrin-unterstützten Extraktionsverfahren weiterbehandelt. Die Gehalte an Referenzsubstanzen in den entstandenen Fraktionen wurden mit der in Arbeitspaket 1 validierten Methode bestimmt.

Im Arbeitspaket 3 wurden die Extrakte und Fraktionen zusammen mit den Referenzsubstanzen auf ihre neuroprotektiven und neuroregenerativen Eigenschaften in zellbasierten Versuchen untersucht. Protektive Eigenschaften können nur nachgewiesen werden, wenn die Proben selbst kaum Auswirkungen auf die Zellviabilität zeigen. Da diese Aktivität konzentrationsabhängig ist, wurde zunächst der IC_{50} der Proben auf SH-SY5Y Zellen (das ist eine Zelllinie, die vielfach als Modellsystem für neurodegenerative Erkrankungen verwendet wird) bestimmt. Dabei lässt sich feststellen, dass der Effekt auf die Zellviabilität der getesteten Substanzen im Zusammenhang mit ihrem chemischen Aufbau steht. So konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Chalkone weniger vom Ringschluss der Prenylgruppe am A-Ring, als von der Anzahl der Doppelbindung des am A-Ring entstandenen Heterozyklus abhängt. Auch ein Vergleich der IC_{50} -Konzentrationen der verschiedenen Chalkone mit denen der Flavanone Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A, zeigten eine deutlich höhere Effekt auf die Zellviabilität der Chalkone. Die Proben wurden im Anschluss in geeigneten Konzentrationen auf ihre neuroprotektive Wirkung gegenüber hypoxischen ($CoCl_2$) und oxidativen Schädigungen (ROS, NO) untersucht. Die neuroprotektive Wirkung der Hopfenextrakte ist stark von der Herstellung abhängig und korreliert nicht direkt mit dem Gehalt an Xanthohumol A. Hierbei muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den gewonnenen Extrakten um Substanzgemische handelt und die resultierenden protektiven bzw. anti-oxidativen Effekte dieser auf das Zusammenspiel verschiedener Inhaltsstoffe beruhen können. Dennoch kann festgehalten werden, dass die säurekatalytische Umwandlung in Kombination mit dem cyclodextrinbasierten Filtrationsverfahren zu Extrakten mit protektivem Effekt in Bezug auf SNP führt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Kettenverlängerung am Strukturmerkmal Prenylseitenkette zu einem positiven Effekt auf die protektive Wirkung in Bezug auf die NO-Schädigung führt. Die im Anschluss durchgeführten Untersuchungen der mit HP- β -Cyclodextrin hergestellten Fraktionen zeigten eine differenzierungsinduzierende Aktivität in einem Zellmodell basierend auf einem dualen Reporter-Gen-Assay auf. Dieser Effekt erwies sich als wesentlich geringer als jener der Positivkontrolle. Allerdings ist dies nicht verwunderlich, da die Extrakte Substanzgemische sind. Vorteilhaft ist, dass die Extrakte keinen so stark ausgeprägten Effekt auf die Zellzahl aufweisen wie die im Assay verwendete Positivkontrolle.

Im Rahmen des Arbeitspaket 4 wurden grundlegende Ansprüche von Verbrauchern an natürliche Gesundheitsprodukte (NHP) wie z. B. pflanzliche Arzneimittel eruiert. Hierfür wurden zunächst qualitative Tiefeninterviews mit 26 Nutzern von NHP durchgeführt. Die Interviews wurden mit der Means-End-Chain-Methode, speziell mit der Laddering-Technik, durchgeführt. Die Methode ermöglicht neben der Identifizierung derjenigen Produktattribute, die Verbrauchern an einem Produkt wichtig sind, auch herauszufinden, warum dies der Fall ist. Des Weiteren wurde in den Interviews die Design-Thinking-Methode Scribble eingesetzt. Dadurch konnten erste Ideen für Produktkonzepte von neuroprotektiv-wirkenden Hopfenprodukten auch visuell festgehalten werden. Aus den Interviews ging hervor, dass insbesondere die Wirkung und Verträglichkeit bei der Wahl von NHP eine Rolle spielen. Damit im Zusammenhang sind Verbrauchern die Inhaltsstoffe und eine entsprechende Deklaration wichtig. In einer anschließenden repräsentativen Online-Umfrage mit 1707 Befragten wurden potentielle Zielgruppen für ein natürliches Gesundheitsprodukt zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung (NHPCC) auf Hopfenbasis eruiert, sowie deren Ansprüche an ein solches Produkt evaluiert. Es konnten zwei potentielle Zielgruppen ausgemacht werden, die dem NHPCC mit Hopfen einen positiven Nutzenwert zuschreiben.

Ziel des Arbeitspakets 5 war es, ein mögliches Produktkonzept auf seine Akzeptanz bei möglichen Verbrauchern zu testen und ggf. zu optimieren. Dazu wurde zunächst ein Choice-Experiment aus der in Arbeitspaket 4 durchgeführten Online-Umfrage ausgewertet. In diesem wurde unter anderem getestet, welche Ausprägungen von ausgewählten Produktattributen die Verbraucher bevorzugen würden, wenn sie die Wahl zwischen 3 Optionen sowie einer zusätzlichen Möglichkeit zur Ablehnung aller vorgeschlagenen Optionen hätten. Den insgesamt höchsten Nutzenwert erlangte der Preis des Produktes. Das größte Vermarktungspotential wurde für ein Produktkonzept mit blauem Glas, ohne Umverpackung, ohne Wechselwirkungen, ausgezeichnet als vegan, das zu einem günstigen Preis (9,99 €) und als pflanzliches Arzneimittel in Apotheken vertrieben würde, gefunden. Zudem wurde eine weitere Online-Umfrage mit 1819 Teilnehmenden durchgeführt, um weitere Ansprüche für ein innovatives pflanzliches Arzneimittel zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung in Dragee-Form mit Hopfenextrakten herauszufinden, bzw. um Ergebnisse aus der vorangegangenen Studie zu evaluieren. Die meisten Menschen wären demnach bereit, bis zu 10 € für das beschriebene Produkt auszugeben und würden sich aber insbesondere weitere Informationen zur Wirkung und den Inhaltsstoffen, v.a. deren Sicherheit betreffend, wünschen.

Zusammenfassend hat dieses Projekt gezeigt, dass auch in bekannten und heimischen Heilpflanzen, wie in diesem Fall dem Hopfen, bisher ungenutztes Potential für innovative NHP steckt, welches für Verbraucher interessant ist. Um vergleichbare Entwicklungen auch bei anderen in Bayern heimischen Pflanzen zu unterstützen, sollte die Politik neue Wege und Strategien wagen sowie die Rahmenbedingungen für eine innovative Umsetzung weiterer Erkenntnisse in Bayern verbessern.

2 Einleitung und Zielsetzung

Pflanzliche Quellen für Arzneimittel stellen wider allen Anscheins die Mehrheit der Rohprodukte für Pharmazeutika dar. Das kommt daher, dass viele nicht nur mittels Raffinations- und Extraktionsmethoden zu den zulassungspflichtigen (Phyto)-Arzneimitteln verarbeitet werden, sondern als Massenprodukte mit „Standardzulassung“ vermarktet, als einfache Teemischungen oder ähnliches zur Selbstmedikation dienen. Beispiele dafür sind Erkältungstees, Verdauungshilfsmittel oder Einreibungen zur äußerlichen Behandlung. Ihre Kenntnis ist oft traditionell und daher weit verbreitet. Innerhalb der EU hatte und hat dieses Marktsegment insbesondere in Deutschland einen guten Ruf, wovon die zahlreichen Firmen zeugen, die Phytopräparate herstellen. Die „grüne“ Welle in der Medizinwahrnehmung von Bevölkerungsschichten („mehr Natur, weniger Apparatedizin“) hat diesem Segment trotz Herausnahme der Phytotherapeutika aus der Erstattungspflicht der Krankenkassen weitgehend über die Krise geholfen. Dazu kommt die mangelnde Qualität von Phytoarzneimitteln aus Importware, wo Pestizidbelastung, Schwermetallgehalt und anderes anzumerken wären.

Harmlose pflanzliche Präparate und Phytopharmaka für den allgemeinen ungeregelten Gebrauch beruhen in ihrer Wirkung genauso wie die hochaktiven auf ursächlichen Inhaltsstoffen. Inhaltsstoffe, die man für die Wirkung verantwortlich macht, gehören meist in die Gruppe der Sekundärmetaboliten. Neben den Terpenkohlenwasserstoffen sind es oft phenolische und polyphenolische Verbindungen, mit diversen Kohlehydraten als Glykoside verbunden, als Flavonoide bzw. Gerbstoffe (Tannine), um nur die größte Gruppe zu nennen.

Diese Substanzen sind wenig toxisch und ihr Wirkungsprofil ist nicht offenkundig, zumindest gibt es sich nicht mit spektakulären Erscheinungen zu erkennen, wie beispielsweise bei den hochaktiven und in ihrer Anwendung dem Facharzt zu überlassenden Fingerhut Präparaten. Diese Inhaltsstoffe sind in der Pflanzenwelt weitverbreitet und auch in vielen Gewürzen und Gemüse zu finden. Daher ist ihr Einfluss bislang unterschätzt worden. Einige Beobachtungen der letzten Dekaden zeigen jedoch, dass ihr Einfluss besonders in einer langfristigen Anwendung liegen kann und legen nahe, dass ihnen als Präventivmaßnahme zur Gesunderhaltung besondere Bedeutung zukommt. Das Grünteescenario geht von der epidemiologischen Beobachtung aus, dass bei langjährigen Grünteetrinkern die Inzidenz von Tumoren des Verdauungstrakts, zumindest der Organe, die ständig direkten Kontakt mit dem grünen Tee haben, signifikant geringer ist als bei anderen Bevölkerungsgruppen. In Europa kennen wir das „Rotweinparadox“, d.h. dass eine mediterrane Ernährung mit viel Fisch, Gemüse aber eben auch Rotwein eine vergleichsweise geringe Inzidenz von Arteriosklerose und anderen Gefäßerkrankungen zur Folge hat. In beiden Fällen lässt sich auch eine Substanzgruppe angeben, die damit zu tun hat, das Epigallocatechingallat beim Grüntee und die Tannine beim Rotwein.

Diese Erkenntnisse begründen die Idee der präventiven Medizin, also nicht die Erkrankung dann zu behandeln, wenn sie auftritt, sondern ihr Entstehen zu verhindern. Dies erfordert allerdings eine entsprechende Umgestaltung des Ernährungsstils, bzw. eine von früher Jugend an einzuhaltende Diät. Nun wäre der Mensch nicht Mensch, wenn er nicht Methoden ersänne, die liebgewonnenen Gewohnheiten der Ernährung beizubehalten und durch ein zusätzliches Ergänzungsmittel die Prävention sozusagen durch die Hintertür einzuführen. Dies ist die Idee mancher Nahrungsergänzungsmittel und stellt ein Zwischenglied dar zu echten Phytopharmaka und Nahrungsmitteln.

Tatsächlich lassen sich wider alle unnützen Vitaminpräparate manche Indizien finden, dass so etwas Sinn haben und funktionieren könnte. Knoblauchpräparate umgehen die aggressiven Wirkungen auf Magen/Darmtrakt bestimmter Personengruppen und machen trotzdem die positiven Wirkungen der schwefelhaltigen Naturstoffe auf die Gefäßalterung zugänglich. Präparate aus rotem Weinlaub haben, nach einer Periode des Dornröschenschlafs und obwohl hochwirksam bei venöser Insuffizienz, zuerst

wieder in der islamischen Welt reüssiert und erfahren jetzt gesteigertes Interesse beispielsweise als Lebensmittelfarben.

Während das Problem der koronaren Herzerkrankungen und ihre Prävention mittlerweile gut etabliert ist, gilt das weniger für eine weitere Volkskrankheit, die neurodegenerativen Erkrankungen. Als neurodegenerative Erkrankungen bezeichnet man einen mehr oder weniger schnellen Abbau von Neuronenstrukturen im zentralen Nervensystem (ZNS) oder auch dem peripheren Nervensystem mit den äußerlich erkennbaren Anzeichen von Störungen der Motorik, von Gedächtnisleistungen oder auch sensorischer Leistungen. Sie sind als „Alzheimer“ oder „Parkinson“ jedermann bekannt. Aufgrund der alternden Bevölkerung ist hier eine erhebliche Steigerung der Zahl der Betroffenen zu befürchten. Gegenüber dem auch hier zu nennenden Schlaganfall (und seinen Folgen) sind sie sehr langsam zu Tage tretende Erscheinungen. Tatsache in dessen ist, dass eine sehr frühe Initialisierung stattfindet, wobei in den folgenden 20-25 Jahren der Organismus unauffällig ist. In beiden Fällen ist der Behandlungsaufwand immens, oft auch nur symptomatisch. Hinzu kommt der Pflegeaufwand.

Unsere Kenntnisse zu präventiven Maßnahmen zur Vorbeugung gegen Parkinson, Alzheimer und andere neurodegenerative Erkrankungen stecken derzeit in den Kinderschuhen, genauso wie vieles bei der Krankheitsentstehung im Dunkeln liegt. Da die Ätiologie der neurodegenerativen Erkrankungen eine sehr lange Vorlaufphase nahelegt, kommt dem Bereich der Ernährung als präventive Maßnahme wahrscheinlich hohe Bedeutung zu.

Von allen genannten chronischen Erkrankungen üben die möglichen neurodegenerativen Erkrankungen in den Augen der Bevölkerung vielleicht den größten Präventionsdruck aus, denn diese erzeugen das Gefühl der nahenden geistigen Gebrechlichkeit, das bei einem jeden an die Eitelkeit geht.

Nervenzellpopulationen sind wie alle Zelltypen normalerweise einem gewissen Turn-Over unterworfen, wobei unbrauchbar gewordene Zellen oft auch kontrolliert absterben (Apoptose). Andererseits trägt das Phänomen der Neuroprotektion dazu bei, angegriffene neuronale Zellpopulationen zu retten bzw. resistent zu machen.

Ein sehr aktuelles Arbeitsgebiet in diesem Bereich besteht darin, nicht nur den Erhalt der Zellpopulation, sondern auch die Funktion der Neuschöpfung neuronaler Zelltypen in Bezug zu Krankheiten des Zentralnervensystems zu setzen. Eine Neuschöpfung von Neuronen durch Ausdifferenzierung aus adulten neuronalen Stammzellen ist auch beim Menschen zu beobachten. Es zeigte sich, dass die sog. Differenzierung adulter neuronaler Stammzellen zu den verschiedenen Zelltypen des Gehirns die „Neurodifferenzierung oder Neurogenese“, eine anteilig geringe Bedeutung hat, findet sie doch ausschließlich in einer Schicht oberhalb des Lateralventrikels statt (Kempermann 2006). Jedoch ist sie stetig über die gesamte Lebenszeit des Menschen hinweg aktiv. Die Neuschöpfung neuronaler Zelltypen hat eine bis jetzt noch wenig verstandene Bedeutung, wenn sie schlecht funktioniert. Es ist aber bereits sehr klar, dass die mangelnde Neuschöpfung von Neuronen durch Ausdifferenzierung von Vorläuferzellen beispielsweise im Hippocampus zu den besagten neurodegenerativen Krankheitsbildern einen Beitrag liefert.

Die Differenzierung von Zellen aus dem Pool neuronaler Stammzellen ist ein Prozess, der durch zahlreiche körpereigene Proteinfaktoren und auch niedermolekularer hormoneller Substanzen gesteuert ist. Das zeigt sich besonders in akuten Zuständen hoher Zelltodrate, etwa beim Schlaganfall, wo beispielsweise die Wiederherstellung der Hippocampus-Leistungsfähigkeit mit einem Ersatz von Zellen in Zusammenhang gebracht wird, die ihren Ursprung in der adulten Stammzellschicht haben (Suzuki et al. 2022). Die Rekreativität ist mit einem hohen Gehalt von bestimmten Neurosteroiden korreliert (Gravanis und Mellon 2011). Weiterhin ist bekannt, dass die Effektivität einiger Antidepressiva davon abhängt, ob Zelldifferenzierung im Hippocampus stattfindet oder nicht (Sahay und Hen 2007). Die Idee, eine wie auch immer geartete Fehlregulation etwa durch Hormone oder

proteinartige Faktoren wie den Nervenwachstumsfaktor (NGF) mit Störungen im Erhalt und Funktionsfähigkeit einer Neuronenpopulation in Beziehung zu setzen, ist ein aktuelles Feld wissenschaftlicher Betätigung der Neuroforschung.

Daraus resultiert auch die Idee, im Fall des konkreten Auftretens der Krankheiten mit ähnlich wirksamen Substanzen pharmazeutisch von außen einzugreifen, bzw. im Aufnehmen und Vorhandensein solcher Stoffe in der Ernährung eine Präventionsstrategie anzulegen.

Zur Alzheimer-Erkrankung gibt es den Forschungsstrang, der eine oxidative Schädigung von Nervengewebe durch mangelhafte Tätigkeit der Mitochondrien, genauer, ihrer im Laufe der Zeit nachlassende Dichtigkeit gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, verfolgt. Zur Entstehung der Depressionen, bipolaren Störungen und Ähnlichem gibt es die Idee, dass der Bau und die Inhaltsstoffe der Nervenmembranen, die Lipide, sich in den letzten 50 Jahren durch veränderte Ernährungsgewohnheiten nachteilig verändert haben (Bazan et al. 2011). Das geht zusammen mit den Kenntnissen, die man von der Pathologie der Arteriosklerose hat. Einigkeit besteht darüber, dass eine ernährungstechnisch bedingte veränderte Membranzusammensetzung, die oxidativ angreifbarer ist als früher, unter den Bedingungen wenig pflanzlicher Nahrung der Auslöser der Plaque-Bildung und ihrer Folgen ist.

Gemäß den Vorgaben der „HighTech Strategie 2020“ Bedarfsfeld Gesundheit/Ernährung; „Mehr Gesundheit durch präventive Ernährung“ besteht ein besonderes Forschungsinteresse an den vielfältigen Wechselwirkungen von Lebensmittelinhaltsstoffen mit dem Körper des Menschen. Insofern gilt dies auch für neurodegenerative Erkrankungen, ihren Ursachen, und der Intervention mit Medikamenten. Darunter fallen auch Strategien mit pflanzlichen Arzneimitteln.

Sollte sich zeigen, dass im Tier- oder Humanversuch eine protektive Wirkung einzelner pflanzlicher Substanzen im Bereich neurodegenerativer Erkrankungen nachgewiesen werden kann, steigt dadurch das Interesse an geeigneten Pflanzenextrakten im Bereich der Lebensmittelzusatzstoffe, der Früchte- und Gemüsesortenwesen, der Extraktions- und Konservierungsverfahren, schließlich der Herstellung pflanzlicher Arzneimittel.

Das Team der Hochschule Weihenstephan-Triesdorf (HSWT) mit ihren Kooperationspartnern und der Paracelsus Medizinischen Privatuniversität Salzburg hat in den letzten Jahren eine Anzahl verschiedener pflanzlicher Inhaltsstoffe auf ihre neuroprotektiven Eigenschaften geprüft, sowie auf ihre Fähigkeit hin, eine adulte neuronale Stammzellen-Population zu verschiedenen neuronalen Zelltypen zu differenzieren. Dabei zeigte sich, dass unter den vielen getesteten Substanzen (Isoflavonoide, Flavonoide, Oliven-Polyphenole und Ester, Steroide, Vitamin E-Derivate, Terpene) Inhaltsstoffe des Hopfens herausragend aktiv waren. Insbesondere haben einige Stoffe des Hopfens, die chromanoiden Prenylflavonoide („CPFs“) die seltene Fähigkeit, Differenzierung aus der neuronalen adulten Stammzellen-Population einzuleiten. Diese Erkenntnisse wurden in einer Patentanmeldung zusammengefasst (Aigner et al. 2012). Außerdem haben Arbeiten zur selektiven Extraktion in Hinblick auf eine größere Massenbasis stattgefunden, die ebenfalls in einer Patentschrift niedergelegt und eingereicht wurden (Riepl und Urmann 2012).

Die oben beschriebenen eigenen Arbeiten zur Identifizierung der Substanzklasse der Prenylflavonoide in Hopfen, welche die Spezialisierung von adulten neuronalen Stammzellen zu Nervenzellen einleiten können, sowie die Entwicklung des speziell auf diese Substanzen zugeschnittenen Extraktionsverfahrens, schaffen die Basis für die Entwicklung eines innovativen Hopfenextraktes zur Behandlung von neurodegenerativen Krankheiten.

Auf Grundlage der genannten Vorarbeiten war es dementsprechend das Fernziel dieses Projekts, auf der Basis der bisherigen Arbeiten ein neues Produkt im Bereich der Phytopharmaka zu entwickeln und damit einen erweiterten Absatzmarkt für Hopfen-verarbeitenden Betriebe in Bayern zu schaffen. Damit

dies gelingen konnte, musste zum einen ein standardisierter und charakterisierter Spezialextrakt angereichert an aktiven Komponenten und zum anderen ein Produktkonzept für dieses Produkt entwickelt werden.

Als Phytopharmazeutikum erfreuen sich Spezialextrakte immer mehr Zuspruch. Grund dafür ist, dass sie als distinkte Wirkstoffe betrachtet werden und somit Qualität, Wirksamkeit und Unbedenklichkeit produktbezogen evaluiert werden. Bis zum Zeitpunkt des Projektstarts gab es keinen Spezialextrakt mit gezieltem Anteil an neuroregenerativen Substanzen. Daher war es nötig eine Verfahrensentwicklung diesbezüglich auszuführen. Weiterhin lag noch kein Spezialextrakt mit genormtem Anteil an neuroregenerativen Substanzen vor. Genauso fehlten Erkenntnisse diesbezüglich über den projektierten Hopfenextrakt mit höherem Gehalt an neuroregenerativen Inhaltsstoffen.

Um vor diesem Hintergrund das o.g. Fernziel zu erreichen, wurden im Projekt die folgenden chemisch-technischen Teilziele verfolgt:

1) Erhöhung des Gehalts an aktiven Komponenten über eine katalytische Umsetzung wenig aktiver Flavonoide:

Die für uns wertgebenden Inhaltsstoffe sind in Hopfen und dem Reststoff aus den Hopfen-verarbeitenden Betrieben eher sehr wenig konzentriert. Jedoch haben Vorversuche ergeben, dass die Konzentration der interessierenden Inhaltsstoffe durch katalytische Umwandlung gesteigert werden kann. Ziel dieses Projektteils war es somit, diejenigen Parameter abzuleiten, die zu einer ausreichenden Umwandlung der interessierenden Inhaltsstoffe unter Berücksichtigung verfahrensrelevanter Parameter und eines günstigen Preis-Leistungs-Verhältnisses führen.

2) Anpassung der Extraktionsparameter an den neu hergestellten Edukt-Extrakt:

Wie im Patent der Antragsteller dargelegt, ist die Extraktion der wertgebenden Inhaltsstoffe grundsätzlich möglich. Durch die katalytische Umsetzung bildet sich jedoch ein Produkt, das nicht direkt im Extraktionsprozess verwendbar ist und dessen Verhalten im Prozess im Vergleich zum Edukt bewertet werden muss. Somit war es Ziel dieses Projektteils, mögliche Vorbehandlungen und die katalytische Umsetzung zu evaluieren. Zudem wurde untersucht in wie weit einzelne Parameter des Verfahrens eine Anpassung an das Produkt bedürfen.

3) Bestimmung des Effektes von Referenzsubstanzen und Extrakten bezüglich der Neuroprotektion und Neuroregeneration:

Der Herstellungsprozess pflanzlicher Arzneiprodukte beeinflusst deren Wirkung entscheidend. Somit ist es notwendig, die verfahrenstechnischen Parameter eng gekoppelt mit den Untersuchungen zur biologischen Aktivität zu bestimmen. Ein weiteres Projektziel war es daher, das Potential weiterer Referenzsubstanzen und hergestellter Extrakte auf die Protektion und Regeneration von Nervenzellen in zellbiologischen Modellen abzuleiten.

Wie oben beschrieben, sollte in dem Projekt zudem ein Produktkonzept für ein solches Phytopharmazeutikum entwickelt und getestet werden, das dem frühen Entwicklungsstadium und den inhärenten Risiken Rechnung trägt. Eigene Vorarbeiten an der HSWT zeigen hohes Interesse von Verbrauchern an und damit verbunden eine starke Nutzung von pflanzlichen Arzneimitteln in Deutschland (Welz et al. 2019a). Zudem ist Hopfen als Arzneimittelpflanze bei Anwendern bekannt und wird insbesondere für seine schlaffördernden Wirkungen geschätzt (Riepl et al. 2018). Allerdings bestehen bislang noch keine Erkenntnisse darüber, wie Verbraucher und Patienten auf Hopfen als Basis für Neuroregeneration reagieren und wie erfolgversprechende Produktkonzepte in diesem Feld aussehen könnten. Daher bestanden im Produktentwicklungsteil dieses Projekts die folgenden Teilziele:

4) Entwicklung eines Produktkonzeptes für ein pflanzliches Arzneimittel auf Hopfenbasis im Bereich der Neuroregeneration

- 5) Ableitung der möglichen Zielgruppe und Testung des Verbraucherinteresses an dem entwickelten Produktkonzept
- 6) Überprüfung der Marktgängigkeit des entwickelten Produktkonzeptes mit Marktsimulationstest

3 Stand des Wissens

3.1 Pflanzliche Arzneimittel und der Markt für pflanzliche Arzneimittel

Entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (WHO) können pflanzlichen Arzneimittel (auch: Phytopharmaka oder englisch: herbal medicine) folgendermaßen definiert werden: „*Herbal medicines include herbs, herbal materials, herbal preparations and finished herbal products that contain, as active ingredients, parts of plants, other plant materials or combinations thereof. In some countries, herbal medicines may contain, by tradition, natural organic or inorganic active ingredients that are not of plant origin (e.g. animal and mineral materials).*“ (World Health Organization 2019, S. 8). Dementsprechend zählen laut dem Verständnis der WHO zu den pflanzlichen Arzneimitteln Heilkräuter, pflanzliche Stoffe und Zubereitungen sowie pflanzliche Fertigprodukte, die als Wirkstoff Pflanzenteile, anderes pflanzliches Material oder Kombinationen daraus enthalten. Darüber hinaus weist die WHO auch darauf hin, dass in manchen Ländern pflanzliche Arzneimittel (PAM) traditionell auch natürliche, organische oder anorganische Wirkstoffe enthalten können, die nicht pflanzlichen Ursprungs sind. Dieser Hinweis macht deutlich, dass es letztendlich keine einheitliche, international geltende Definition von PAM gibt und regionale Unterschiede im Verständnis bestehen. In Deutschland ist die rechtliche Begriffsdefinition durch das Arzneimittelgesetz (AMG) (§4 Abs. 29 i. V. m. §2 Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln) festgelegt und an eine Richtlinie der EU angelehnt. Nach §4 Abs. 29 AMG dürfen PAM ausschließlich pflanzliche Bestandteile aufweisen. Dementsprechend ist der Zusatz von Wirkstoffen nicht-pflanzlichen Ursprungs untersagt (Amm 2021).

In Deutschland wird die Zulassung und das Inverkehrbringen von Arzneimitteln durch das Gesetz über den Verkehr mit Arzneimitteln (Arzneimittelgesetz, AMG) geregelt. Entsprechend dem AMG brauchen alle Stoffe, die Arzneimitteln nach §2 AMG sind, meistens ein Zulassungsverfahren und die Zustimmung durch die zuständige Bundesoberbehörde (vgl. §21 AMG). Im Zulassungsverfahren müssen z. B. Informationen über Darreichungsform, Anwendungsgebiete und Nebenwirkungen sowie auch Studien zur Belegung der medizinischen Wirkung gegeben werden (vgl. §22 AMG). Grundsätzlich fallen auch pflanzliche Arzneimittel unter diese Regelung. Eine Ausnahme bilden jedoch die Zulassungsverfahren für sogenannte traditionelle pflanzliche Arzneimittel, bei deren Zulassung es möglich ist, auf Studien zur Wirksamkeit zu verzichten. Voraussetzung dafür ist, dass sie seit mehr als 30 Jahren (davon 15 Jahre in der Europäischen Union) angewendet werden und die pharmakologische Wirkung bzw. die Wirksamkeit auf Basis dieser langjährigen Erfahrungen und Anwendungen plausibel ist (Europäisches Parlament und Europäischer Rat 2005; Amm 2021).

Auch bei der Apothekenpflichtigkeit von PAM gibt es unterschiedliche Regelungen, da eine freie Verkäuflichkeit auf Basis der Verordnung über apothekenpflichtige und freiverkäufliche Arzneimittel (AMVerkRV) in bestimmten Fällen möglich ist. Zu diesen Ausnahmen zählen v.a. viele traditionelle PAM. Dagegen sind Arzneimittel mit pflanzlichem Ursprung, die als normale Arzneimittel vertrieben werden, normalerweise apothekenpflichtig (aponet.de 2020; Amm 2021).

Im Jahr 2021 wurden insgesamt ca. 97 Mio. Packungen PAM in Deutschland abgesetzt. Auffällig ist hierbei, dass das Absatzvolumen im Vergleich zum Vorjahr Pandemie-bedingt das zweite Jahr in Folge rückläufig war (BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie 2022). Die abgesetzten PAM werden grundsätzlich in einem breiten Spektrum an Erkrankungen eingesetzt und anteilmäßig am meisten zur Behandlung von Erkältungsbeschwerden eingenommen. Bei ca. 8 % der abgesetzten Packungen handelte es sich 2021 um Beruhigungs- und Schlafmittel, etwa Baldrian, Lavendel oder Hopfenmischpräparate (BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie 2022).

Betrachtet man den Apothekenmarkt insgesamt, so spielen pflanzliche Arzneimittel umsatz- (1,7 %) und absatzmäßig (6 %) eine eher untergeordnete Rolle (BPI, Bundesverband der pharmazeutischen

Industrie 2021). Anders verhält sich dies jedoch im Teilmarkt der nicht-verschreibungspflichtigen Arzneimittel. Hier haben PAM 2021 ein Anteil von ca. 20 % am Umsatz, wobei hierbei die nicht-verordneten Phytopharmaka umsatzmäßig eine viel höhere Bedeutung aufweisen als die verordneten PAM (17 % vs. 8 %). Dementsprechend werden die PAM v.a. zur Selbstmedikation eingesetzt (BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie 2022). Eine genauere Analyse der Vertriebskanäle von PAM zeigt weiterhin, dass der dominierende Kanal die Apotheke OTC (over the counter)/OTX¹ darstellt, mit einem Anteil am Absatz in Packungen 2021 von 78 %. Der Rest wird überwiegend außerhalb der Apotheke OTC (36%) oder als Gesundheitsmittel außerhalb der Apotheke (6 %) vertrieben (B.A.H. 2022).

3.2 Hopfen und Vorarbeiten zu Hopfen in der Phytomedizin

Der Hopfen – *Humulus lupulus* L. – wird seit 860 nach Christus vorwiegend für die Brauindustrie kultiviert. Das weltweit größte zusammenhängende Anbaugebiet stellt die Hallertau in Bayern dar. Die erste schriftliche Erwähnung der Verwendung von Hopfen in der Phytotherapie stammt von Mesue dem Jüngeren (gest. 1050 n. Chr.) (Windhaber 2006). Demnach gehören Hopfenpräparate gemäß der Klassifikation der European Medicines Agency (EMA) zu den traditionellen pflanzlichen Arzneimitteln. Hopfen hat im Bereich der Phytotherapie verschiedene Anwendungsbereiche. Er wird und wurde beispielsweise als mildes Schlafmittel eingesetzt. Zudem wirkt er auch als mildes Sedativum bei nervösen Unruhezuständen, die beispielsweise durch Stressfaktoren hervorgerufen werden.

In eigenen Arbeiten des Fachgebiets für Organisch-analytische Chemie (OAC) wurde durch eine aktivitätsgeführte Fraktionierung eine Substanzklasse aus Hopfen identifiziert. Diese zeigt die Förderung der Differenzierung von neuronalen adulten Stammzellen in einem Zell-basierten Assay (Oberbauer et al. 2013). Zudem zeigte sich, dass dieser Effekt auf ein bestimmtes strukturelles Merkmal zurückführbar ist, welches die Klasse der Pyranoflavonoide gemein hat. Mit Hilfe von immunzytochemischen Beobachtungen wurde bestätigt, dass Substanzen aus dieser Klasse die tatsächliche Neubildung von Neuronen durch das Differenzieren aus der Stammzellpopulation anregen. Für diese Substanzklasse wurde ein Patent [WO 2012172090 A1 20121220] erteilt (Aigner et al. 2012).

Die Einleitung des körpereigenen Regenerationsmechanismus durch kleine Moleküle ist ein neuartiger Therapieansatz. Dieser ist aufgrund der beschränkten Verfügung von Substanzen mit diesem Wirkschema allerdings noch eher der Grundlagenforschung zuzuordnen. Bisher wurden schon verschiedene sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe auf ihre Aktivität zur Differenzierungsinduktion in Richtung Nervenzellen (Neurogenese) untersucht. So lösen Fisetin, Luteolin, Isorhamnetin, Quercetin und Genestein im PC12-Zellenmodell unspezifisch und schwach die Neurogenese aus (Sagara et al. 2004; Liu et al. 2010). Bei PC12 Zellen handelt es sich um einen neuroendokrinen Tumor aus dem Nebennierenmark von Ratten. Zudem wurde gezeigt, dass Liquiritigenin in neuronalen Vorläuferzellen der Ratten die Neurogenese induziert. Außerdem zeigt Oroxylin A *in vivo* bei Mäusen eine Neurogenese-induzierende Aktivität, wohingegen Baicalin aus *Scutellaria baicalensis* die Neurogenese in C17.2 Maus Zellen auslöst. Weiterhin ist bekannt, dass Wogonin, ebenfalls aus *Scutellaria baicalensis*, die Differenzierung und das Nervenwachstum von neuronalen Vorläuferzellen der embryonalen Ratte induziert. Auch bei der Gruppe der Epicatechine (20 mg/kg/d) wurde eine verstärkende Wirkung bei der Neurogeneseinduktion zum Patent angemeldet (Lee et al. 2010; Li et al.

¹ OTC-Arzneimittel („over the counter“). Ursprünglich: rezeptfreie Arzneimittel, die ausschließlich in der Apotheke „über den Handverkaufstisch“ und nicht in Freiwahl/ außerhalb von Apotheken feilgeboten werden durften (apothekenpflichtig). Heute: oft auch Subsumation von freiverkäuflichen Arzneimitteln/ anderen Gesundheitsmitteln; OTX-Arzneimittel: rezeptfreie Arzneimittel, die von einem Arzt auf Privatrezept, Grünem Rezept oder GKV-Rezept verordnet werden (B.A.H. 2022).

2011; Lim et al. 2010). Eigene vergleichende Untersuchungen belegen, dass die aktivsten getesteten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe im Zellkulturmodell die des Hopfens sind (Oberbauer et al. 2013).

Bei Präparaten in der Phytotherapie wird zwischen der Verwendung des Rohstoffs „Heilpflanze“ (der sogenannten „Droge“) und den wirksamkeitsrelevanten Extrakten differenziert. Der Extrakt mit all seinen Inhaltsstoffen stellt den Wirkstoff des Phytotherapeutikums dar. Aus einer Heilpflanze können je nach verwendetem Herstellungsverfahren unterschiedlich wirksame Extrakte gewonnen werden. Wenn das Verfahren mehrstufig ist und aufwendiger ist, als Auszüge aus Drogen herzustellen, spricht man i.d.R. von Spezialextrakten. Vorteil solcher Extrakte ist es, dass gezielt unerwünschte Komponenten entfernt sowie gewünschte Komponenten angereichert werden. Dementsprechend können zuverlässige therapeutische Ergebnisse von Phytopharmaka nur erreicht werden, wenn neben der Chargenkonformität auch die Extrakterstellung standardisiert wird und somit das Wirkspektrum gleichbleibend ist.

Anhand früherer Untersuchungen des Fachgebietes OAC zum physikalisch-chemischen Verhalten der Pyranoflavonoide ließ sich in Hinblick auf eine Anwendbarkeit zur Trennung ein Extraktionsverfahren konzipieren. Dieses Verfahren beruhte auf der aktivsten Substanz Xanthohumol C, welche allerdings nur in sehr geringen Konzentrationen in Hopfen vorliegt. Eine Umwandlung von Xanthohumol in Xanthohumol C ist nur mit Mitteln, welche weder in Nahrungsmitteln noch in Phytopharmazie zulässig sind, möglich.

Xanthohumol A unterscheidet sich von Xanthohumol C durch eine Doppelbindung im Pyranoring und kann durch säurekatalytische Umwandlung aus Xanthohumol gewonnen werden. Die Differenzierungs-induzierende Aktivität von Xanthohumol A und Xanthohumol C kann als ähnlich erachtet werden. Dieses Verfahren wurde ebenfalls zum Patent angemeldet [DE 102012105613 A1] und beruht auf dem Einsatz von Cyclodextrinen. Bei Cyclodextrinen handelt es sich um torus-artige Makromoleküle. Diese können aufgrund ihrer Geometrie unterschiedlich kleine Moleküle im Innern einschließen und somit die physikalischen Eigenschaften der eingeschlossenen Moleküle verändern.

Die beschriebene Methode zur Anreicherung der Pyranoflavonoide mittels Cyclodextrinen besteht hauptsächlich aus der Herstellung einer festen Phase aus dem Rohextrakt und weiteren polymeren Materialien, welche im Anschluss mit Lösungsmitteln ausgewaschen werden. Durch die Zugabe von Cyclodextrinen in die flüssigen Phasen wird durch das unterschiedliche Maß der Einschlussbildung der verschiedenen Hopfeninhaltsstoffe eine Trennung bezüglich Größe, Struktur und Geometrie erreicht. Geeignete zusammengesetzte Flüssigphasen mit Cyclodextrinen lösen daher bestimmte Inhaltsstoffe, wobei andere dagegen ungelöst bleiben.

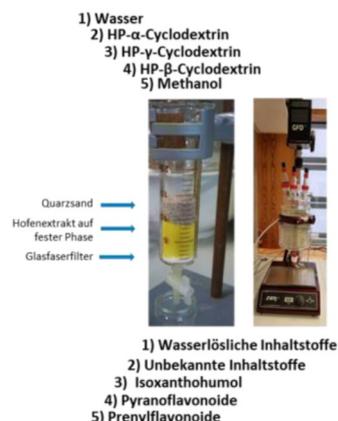


Abbildung 1. Schematische Darstellung des Cyclodextrin-unterstützten Filtrationsverfahrens. Links: Laboraufbau unterschiedliche Schichten sichtbar. Rechts: Filtertrockner für Upscaling und Standardisierung.

3.3 Nutzung von pflanzlichen Arzneimitteln und anderen natürlichen Gesundheitsprodukten, Zielgruppen und Produktattribute

Arbeiten zur Nutzung von PAM in Deutschland weisen auf sehr hohe Prävalenzraten hin. Diese betragen 75,4 % bei einer 12-Monats-Prävalenz und 86,7 % bei einer lebenslangen Prävalenz im Jahr 2018 in Deutschland (Welz et al. 2019a). Innerhalb der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeiten konnten zudem eine ganze Reihe von Gründen identifiziert werden, warum pflanzliche Arzneimittel benutzen wurden. Als wesentliche Beweggründe kristallisieren sich dabei z. B. Unzufriedenheit mit der konventionellen Medizin, gute Erfahrungen mit und spezifischer Nutzen von pflanzlichen Arzneimitteln in der Vergangenheit sowie Familientraditionen heraus. Ähnliche Beweggründe wurden auch in Studien in anderen Ländern gefunden (Kennedy 2005; Gardiner et al. 2007). Eine Fokusgruppenstudie mit Nutzern von pflanzlichen Arzneimitteln in Deutschland zeigte allerdings auch eine fehlende Risikowahrnehmung bei der Verwendung solcher Medikamente, da Neben- und Wechselwirkungen bei der Nutzung häufig ausgeblendet werden, gerade wenn man pflanzlichen Arzneimitteln positiv gegenübersteht. Bedeutende Gründe für die PAM-Nutzung sind z. B. positive Aspekte, die diesen zugeschrieben werden (z. B. natürlicher Charakter, milde Wirkungen, geringe Nebenwirkungen). Dagegen sind Enttäuschungen mit der konventionellen Medizin in diesem Zusammenhang am wenigsten wichtig. Für Deutschland konnte zudem als wesentliche treibende Kraft der Nutzung die positive Rolle von Familientraditionen identifiziert werden (Welz et al. 2019b; Sirois 2008). Eine wesentliche Rolle für die erstmalige PAM-Nutzung scheinen Enttäuschungen mit der konventionellen Medizin zu spielen. Demgegenüber sind positive Aspekte, die PAM zugeschrieben werden, und Familientraditionen v. a. für die langjährige Nutzung entscheidend (Welz et al. 2019b). Darüber hinaus sind potenzielle Zielgruppen für pflanzliche Arzneimittel in Deutschland eher weiblich, mit höherer Ausbildung, in größeren Haushalten lebend und privat krankenversichert (Welz et al. 2019a). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für andere Ländern wie USA, Türkei, Schweden oder Italien gefunden (Kennedy 2005; Gardiner et al. 2007; Rashrash et al. 2017; Al-Windi 2004; Zaffani et al. 2006).

Zusammenfassend zeigen die Literaturergebnisse ein hohes Interesse von Verbrauchern an pflanzlichen Arzneimitteln, das auch für neuartige Anwendungen oder Rohstoffpflanzen genutzt werden kann.

Im deutschsprachigen Raum gibt es keine einheitliche Definition zu natürlichen Gesundheitsprodukten. Angelehnt an die offizielle Definition in Kanada umfassen NHP in der Regel freiverkäufliche pflanzliche Arzneimittel, Nahrungsergänzungsmittel und weitere traditionelle medizinische Produkte auf Basis natürlicher Inhaltsstoffe (Canada 23.12.2021).

Für die Ausarbeitung eines Produktkonzepts waren daher im Rahmen dieses Forschungsvorhabens auch diese anderen Formen (z. B. Nahrungsergänzungsmittel) und damit einhergehend auch deren Zulassungsform von Interesse. In Deutschland unterscheiden sich Nahrungsergänzungsmittel und freiverkäufliche Arzneimittel in Bezug auf die vor der Markteinführung notwendigen Prüf- und Zulassungsverfahren. Nahrungsergänzungsmittel gelten als Lebensmittel, die nicht dazu bestimmt sind, Krankheiten zu verhüten oder zu heilen. Sie unterliegen dem Lebens- und Futtermittelgesetzbuch sowie der Nahrungsergänzungsmittelverordnung und müssen beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit angezeigt werden. (Pflanzliche) Arzneimittel hingegen dienen der Heilung, Verhütung oder Linderung von Krankheiten oder Symptomen. Sie unterliegen dem Arzneimittelgesetz und der Arzneimittel- und Wirkstoffherstellungsverordnung und müssen Prüf- und Zulassungsverfahren durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte durchlaufen. Während bei Nahrungsergänzungsmitteln gesunde Verbraucher die Zielgruppe bilden, sind es bei pflanzlichen Arzneimitteln Patienten (Kooperation Phytopharmaka 2015).

Zur Gewährleistung der Produktsicherheit ist es bei neuen Gesundheitsprodukten wichtig, ein auf die Konsumenten abgestimmtes Produktdesign, inklusive der Darreichungsform zu entwickeln. Ein an die

Konsumenten angepasstes Produktdesign begünstigt eine sichere und einfache Verwendbarkeit des Produkts und reduziert das Risiko von Medikationsfehlern (Drumond 2020; Stegemann et al. 2016).

Am häufigsten angewandt und verbreitet sind feste Darreichungsformen. Flüssige Darreichungsformen kommen vor allem bei Menschen mit Schluckschwierigkeiten, z. B. Kindern oder älteren Menschen, zum Einsatz (Drumond 2020). Feste Darreichungsformen sind neben der klassischen Tablette auch Kapseln, Dragees sowie Minitabletten, die sich durch eine leichtere Schluckbarkeit auszeichnen. Für diese Formen kommen hinsichtlich der Verpackung üblicherweise Drückblister und Verpackungen mit Flägel- oder Schraubverschlüssen zum Einsatz. Drückblister sind in der Herstellung dabei die günstigste Option. Da sie allerdings für Wasser und Gase durchlässig sind, sind sie für empfindliche Gesundheitsprodukte eher ungeeignet. Alternativ besteht die Möglichkeit der Verwendung von Trockenmitteln im Deckel oder direkt mit in der Tablette verpresst. Wenn das nicht möglich ist, gibt es noch die Option von Peel-Push-Blistern. Bei diesen schützt eine Aluminiumbeschichtung vor äußeren Einflüssen. Zu beachten ist dabei allerdings, dass diese Art der Verpackung durch eine schwierigere Öffnung nicht für Konsumenten mit motorischen Einschränkungen geeignet ist (Drumond et al. 2017).

Bei der Gestaltung des Verpackungsdesigns ist zudem die Farbauswahl ein wichtiger Aspekt, insbesondere wenn es sich um freiverkäufliche Produkte handelt und der Verbraucher beim Erwerb beispielsweise vor einem Regal mit mehreren wirkähnlichen oder -gleichen Optionen steht. Im Gesundheitsbereich werden die Farben Braun, Rot und Grau vornehmlich mit Arzneimitteln für schwerere Krankheiten assoziiert. Grün und Gelb hingegen vermitteln eher den Eindruck, ein Produkt sei für leichtere Krankheiten bestimmt und wecken die Erwartung an einen niedrigeren Preis. Rote und braune Verpackungen werden eher mit höheren Preisen in Verbindung gebracht. Blau- und Grüntöne wecken zudem den Eindruck, dass bei der Verwendung des Produkts möglicherweise weniger Vorsichtsmaßnahmen notwendig seien als bei solchen mit z. B. brauner Verpackung. Allgemein werden Gesundheitsprodukte mit Verpackungen in dunkleren Farben als eher teurer, schneller wirksam, anfälliger für Nebenwirkungen und heilender angesehen (Rouillet und Droulers 2005). Je nach Verpackungsgröße bzw. Inhaltsmenge und der Erwartung an die Wirkung eines pflanzlichen Gesundheitsproduktes zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung sind die meisten Verbraucher bereit zwischen 3 und 15 Euro auszugeben (Serifi 2017). Studentische Zielgruppen würden einen Einsatz in Prüfungsphasen in Erwägung ziehen. Arbeitnehmer würden es zur Aufrechterhaltung der Work-Life-Balance und allgemeinen Unterstützung bei alltäglichen Herausforderungen nutzen. Letzteres ist auch für ältere Menschen interessant, die sich zudem den Erhalt persönlicher Unabhängigkeit versprechen würden. Je nach Produkt- und Vermarktungskonzept könnte ein innovatives Gesundheitsprodukt zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung entsprechend in nahezu allen Altersgruppen Anklang finden (Aschenbrenner 2018).

4 Vorgehen, Ergebnisse und Diskussion

4.1 Arbeitspaket 1

Das Ziel des Arbeitspaketes 1 war die Erhöhung des Gehaltes an aktiven neurodifferenzierenden Komponenten über die katalytische Umsetzung wenig aktiver Flavonoide. Aktive prenylierte Hopfen-Flavonoide, in Bezug auf die Differenzierungs-induzierende Aktivität, weisen alle das Strukturmerkmal des Pyrano-Rings auf. Xanthohumol, welches kaum eine Differenzierungs-induzierende Aktivität zeigt, lässt sich durch Säure-katalytische Umsetzung zu Xanthohumol A, welches den Pyranoring als Strukturmerkmal trägt, umwandeln (Abbildung 2).

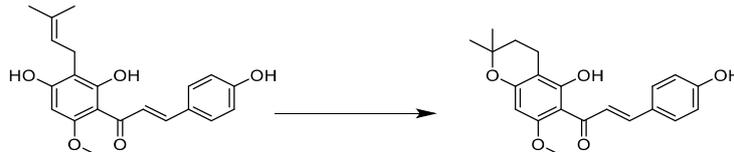


Abbildung 2. Umwandlung Xanthohumol in Xanthohumol A.

Um die Parameter der Umwandlung zu untersuchen, wurden zunächst die benötigten reinen Referenzsubstanzen synthetisiert und im Anschluss eine analytische Methode zur Quantifizierung der Gehalte entwickelt und validiert. Bekannt war, dass die katalytische Umwandlung mittels Ameisensäure durchgeführt werden kann. Diese kann im Gegensatz zu Essigsäure, allerdings eher nicht als lebensmitteltauglich eingestuft werden. Des Weiteren wird in zahlreichen Rezepturen der traditionellen chinesischen Medizin indes das Behandeln der Pflanzen mit Essig vorgeschrieben, so dass eine Essigsäure-katalysierte Behandlung versuchsweise in Angriff genommen wurde. Im nächsten Schritt wurde mittels statistischer Versuchsplanung die katalytische Umsetzung von Xanthohumol zu Xanthohumol A durch Essigsäure optimiert. Eine direkte Übertragung der optimierten Parameter auf den Einsatz des Trebers war insofern nicht möglich, als der größte Anteil des Produktes im Treber verblieb. Dementsprechend wurde im Folgenden die Extraktion des Produktes aus dem Treber bzgl. Extraktionsmittel, Extraktionszeit und Extraktionstemperatur optimiert. Anschließend wurde die katalytische Umsetzung mit Treber, alkoholischem Extrakt und zuckerfreiem alkoholischem Extrakt durchgeführt und die Gehalte der Referenzsubstanzen bestimmt.

4.1.1 Synthese der Referenzsubstanzen

Neben Xanthohumol, welches zu den häufigsten Vertretern der Flavonoide im untersuchten Treber zählt, kommen auch geringe Mengen an Xanthohumol A, Xanthohumol C, Isoxanthohumol in Hopfen vor (Stevens et al. 1997). Bei der katalytischen Umsetzung war damit zu rechnen, dass neben den gewünschten Produkten auch die isomeren Flavanone Isoxanthohumol A und Isoxanthohumol C entstehen können, weshalb auch diese als Referenzsubstanzen (Abbildung 3) synthetisiert wurden.

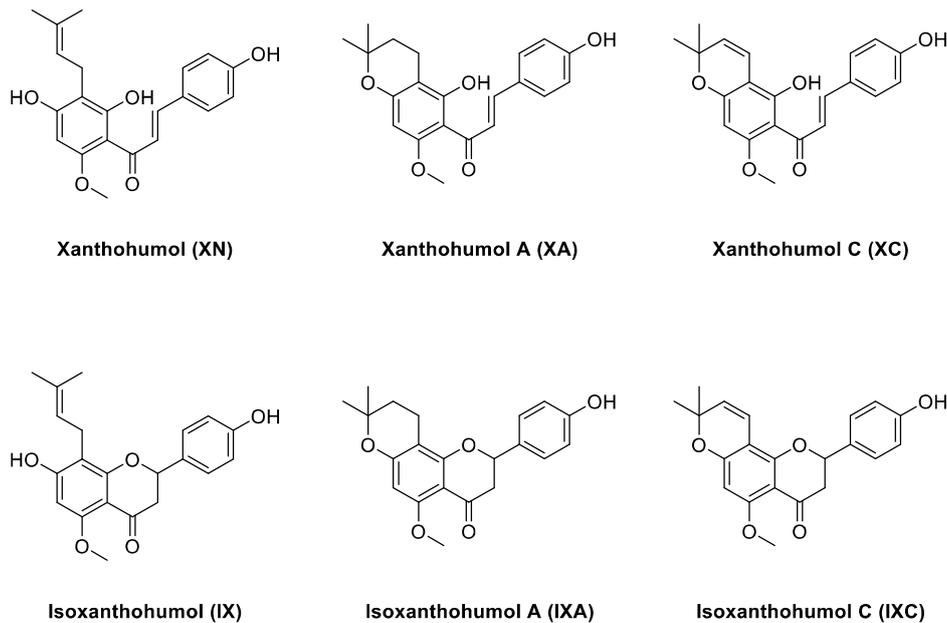


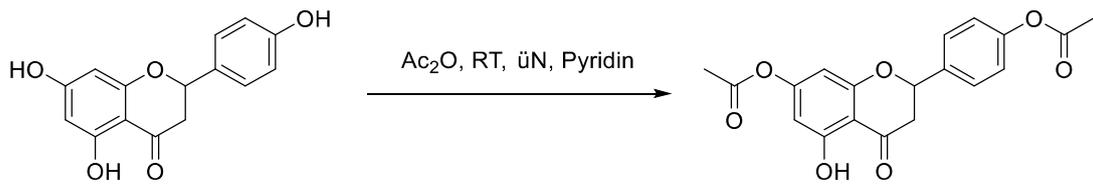
Abbildung 3. Relevante Inhaltsstoffe der Treber.

Reines Xanthohumol wurde aus dem technischen Hopfenextrakt Xantho-Flav® (Hallertauer Hopfenveredelungsgesellschaft m.b.H.) durch Umkristallisation gewonnen. Xanthohumol A wurde durch die Umsetzung von Xanthohumol in Ameisensäure als Lösungsmittel bei 50 °C in der Mikrowelle hergestellt. Xanthohumol C wurde ebenfalls aus Xanthohumol gewonnen. Der Ringschluss mit Aromatisierung wurde mit DDQ in Benzol bei 120 °C in der Mikrowelle erreicht. Das Flavanon Isoxanthohumol wurde aus dem Chalkon Xanthohumol mittels basenkatalytischer Cyclisierung hergestellt. Die weiterführende Reaktion mittels DDQ führte auch hier zum Ringschluss und der Aromatisierung der Prenylseitenkette (Oberbauer et al. 2013).

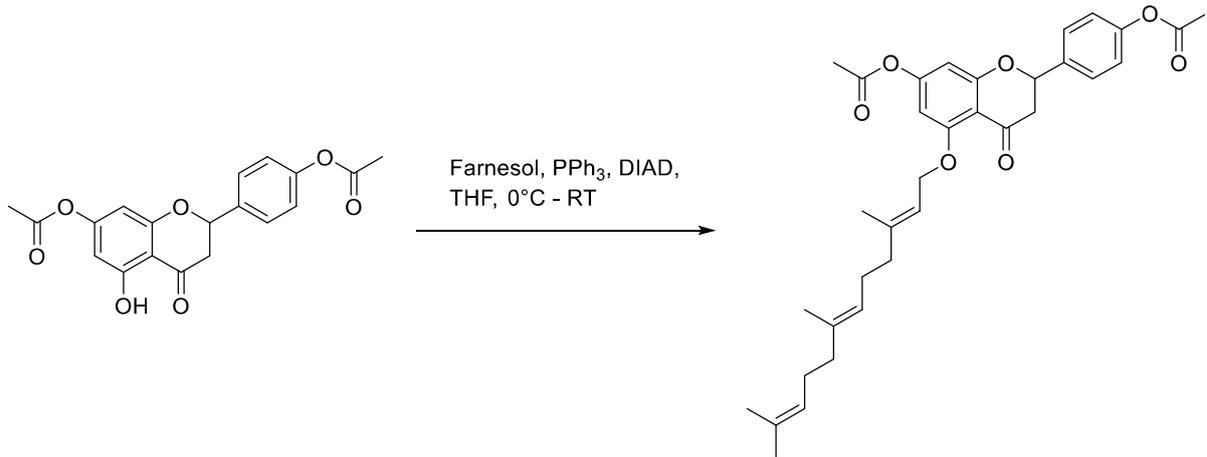
8-Prenylnaringenin und 6-Prenylnaringenin sind ebenfalls bekannte Inhaltsstoffe des Hopfens und wurden mittels Mikrowellen-unterstützter Demethylierung aus Xanthohumol gewonnen (Urmann und Riepl 2020). Neben dem bereits erwähnten prenylierten Flavonen, wurden auch die geranylierten Hopfeninhaltsstoffe 6- und 8-Geranylnaringenin synthetisiert. Dazu wurde in mehreren metallkatalysierten Stufen zunächst 6-Allylnaringenin hergestellt, welches anschließend zum 8-Allylnaringenin umgelagert wurde, analog der Methode von (Tischer und Metz 2007). Durch Metathese wurden die Allylgruppen dieser beiden Verbindungen zu 6- bzw. 8-Geranylnaringenin erweitert (Tischer und Metz 2007). Des Weiteren wurde auch 8-Farnesylnaringenin synthetisiert, welches das Produkt der Kettenverlängerung der Prenylgruppe um zwei Isopreneinheiten ist. Für diese Substanz ist ebenfalls ein neuroregenerativer Effekt bekannt (Urmann et al. 2015). Hierzu wurde in der oben beschriebenen Mitsunobu-Reaktion Farnesol eingesetzt, welches nach Umlagerung und Entschützen 8-Farnesylnaringenin ergab (Abbildung 4).

Alle Substanzen wurden über präparative HPLC (RP) aufgereinigt um reine Standards für die Kalibrierung zu erhalten. Die analytischen Daten der synthetisierten Substanzen entsprechen denen in oben zitierten Publikationen. Die gewonnenen Referenzsubstanzen wurden sowohl in der chemischen Analytik (HPLC-Analyse) wie auch für die biologische Analytik (Zellversuche, Bioaktivitätsbestimmung) verwendet.

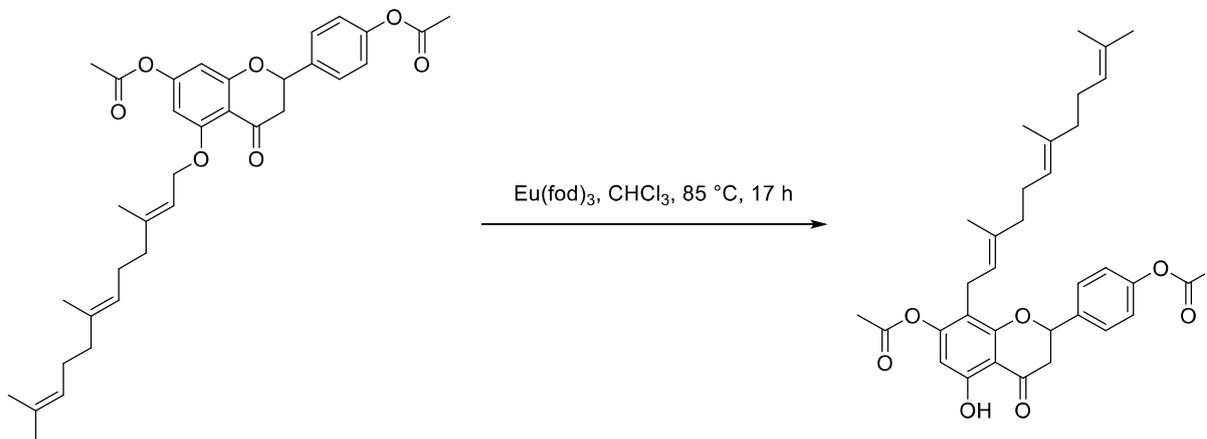
1) Schützen des Naringenins durch Acetylierung



2) Mitsunobu-Reaktion



3) Umlagerung zum 8-Farnesylnaringenindiacetat



4) Entschützen zum 8-Farnesylnaringenin

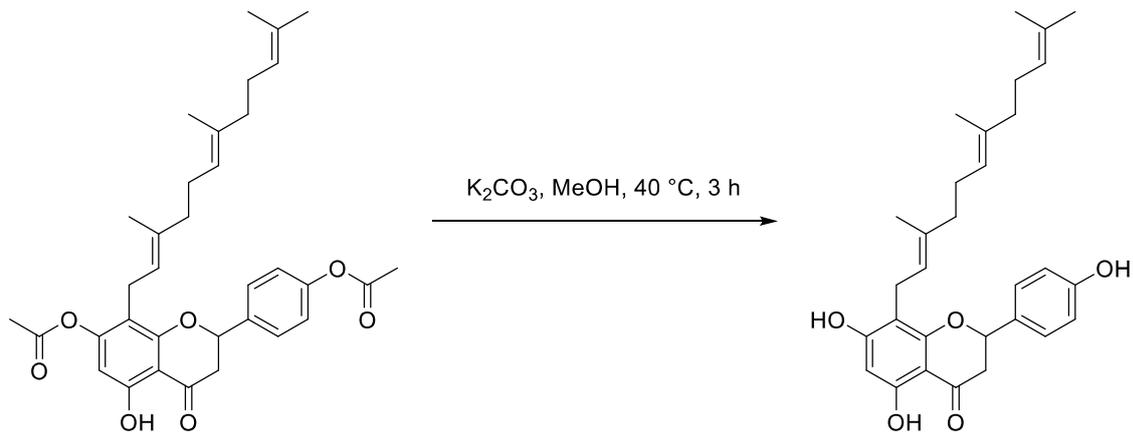


Abbildung 4. Synthese von 8-Farnesylnaringenin

4.1.2 Erstellung der analytischen Methoden

Um die Treber-Extrakte auf den Gehalt der untersuchten Hopfeninhaltsstoffe analysieren zu können, wurde eine Methode mit geringer Analysendauer auf der HPLC entwickelt. Die HPLC-Analytik wurde mit einem System der Firma Shimadzu mit zwei Pumpen LC-20AD, Probengeber SIL-20AC HT, Säulenofen CTO-20A und PDA-Detektor SPD-M20 durchgeführt. Die Optimierung der Methode führte zur Verwendung einer core-shell Säule der Firma Phenomenex (Kinetex C18 Säule 50 x 2,1 mm, 2,6 μ , 100 Å). Untersuchungen zur Selektivität, Trennleistung und Auflösung der Chromatographiemethode ergaben einen Fluss von 0,4 mL/min, eine Säulentemperatur von 30 °C und die Verwendung eines Lösungsmittelgradienten (Tabelle 1) als optimierte Parameter.

Tabelle 1. Einstellungen des Gradienten für die Analyse mit der Kinetex C18 Säule. Als Laufmittel dienten Wasser mit 0,1 % Ameisensäure (A) und Acetonitril mit 0,1 % Ameisensäure (B).

Zeit	B-Konzentration
0,30 min	35 %
5,00 min	95 %
6,00 min	95 %
6,15 min	35 %

Die Gehaltsbestimmung erfolgte über den Einsatz der synthetisierten Referenzsubstanzen (siehe Synthese Referenzsubstanzen). Hierzu wurden jeweils Kalibriergeraden (Abbildung 5) der Referenzsubstanzen ($\beta = 0.01 - 0.4$ mg/mL) erstellt und die Bestimmungsgrenze (LOQ) sowie die Nachweisgrenze (LOD) (Tabelle 2) nach ICH Q2 (R1) Richtlinien bestimmt. Die Detektion der Chalkone erfolgte bei $\lambda = 370$ nm, die der Flavanone bei $\lambda = 290$ nm.

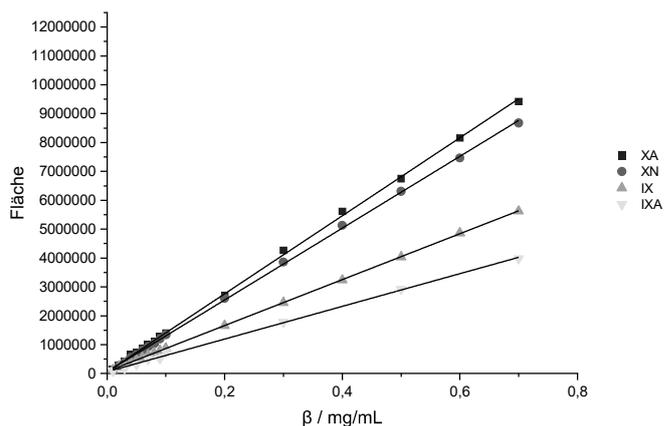


Abbildung 5. Kalibriergeraden der Flavonoide gemessen bei $\lambda = 370$ nm (Xanthohumol, Xanthohumol A) bzw. $\lambda = 290$ nm (Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A).

Tabelle 2. Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen der HPLC-Methode.

	Nachweisgrenze (LOD)	Erfassungsgrenze	Bestimmungsgrenze (LOQ)
XN	0,005 mg/mL	0,010 mg/mL	0,014 mg/mL
XA	0,006 mg/mL	0,012 mg/mL	0,019 mg/mL
IX	0,002 mg/mL	0,003 mg/mL	0,005 mg/mL
IXA	0,014 mg/mL	0,029 mg/mL	0,044 mg/mL

4.1.3 Extraktion und Versuche mit dem Hopfentreber

Als Quelle für die regenerativ wirkenden Pyranoflavonoide wurden in diesem Projekt die Rückstände aus der CO₂-Extraktion von Hopfen verwendet, welche ein Nebenprodukt der Hopfenextraktherstellung für die Bierbrauindustrie sind. Solche Rückstände können Xanthohumol-Mengen von ca. 1 % der Trockenmasse enthalten (Anioł und Żolnierczyk 2008). Der für diese Untersuchung verwendete Hopfenrückstand aus einer überkritischen CO₂-Extraktion der Firma Hopsteiner lag in Form von Pellets vor. Diese Pellets wurden vor der Weiterverarbeitung zu feinem Pulver zerkleinert. Die Messung der Trockenmasse ergab einen Feuchtegehalt von 9,94 %.

4.1.3.1 Optimierung der katalytischen Umsetzung mittels statistischer Versuchsplanung

Ziel war es die Ameisensäure, welche derzeit für die katalytische Umsetzung verwendet wurde durch die lebensmitteltaugliche Essigsäure zu ersetzen. Hierzu wurde im ersten Schritt an der Modellsubstanz Xanthohumol mittels statistischer Versuchsplanung die wichtigsten Einflussfaktoren der katalytischen Umwandlung bestimmt. Des Weiteren wurde eine Optimierung der Reaktionsparameter durchgeführt. Als Zielgrößen wurden die Gehalte an Xanthohumol, Xanthohumol A, Isoxanthohumol und Isoxanthohumol A festgelegt. Als Einflussfaktoren wurden der Anteil an Essigsäure, die Reaktionstemperatur und die Zeit festgelegt. Der vollfaktorielle Versuchsplan mit 5 Zentrumpunkten und Sternpunkten wurde mit den in Tabelle 3 dargestellten Grenzen verwendet.

Tabelle 3. Grenzen des Vollfaktor-Versuchsplans.

	Untere Grenze	Obere Grenze
Essigsäure (%)	10	100
Temperatur (°C)	30	150
Zeit (h)	1	23,8

Der Versuchsplan wurde in der automatisiert randomisierten Reihenfolge abgearbeitet. Die Konzentration der jeweiligen Zielgrößen wurden über die validierte HPLC-Methode bestimmt. Als Haupteinflussgrößen für die Entstehung von Xanthohumol A konnte die Temperatur identifiziert werden, wobei als wichtiger Faktor für die Umwandlung von Xanthohumol der Anteil an Essigsäure identifiziert werden konnte. Die Multi-Response Analyse ergab die in Abbildung 6 dargestellte Wirkungsfläche.

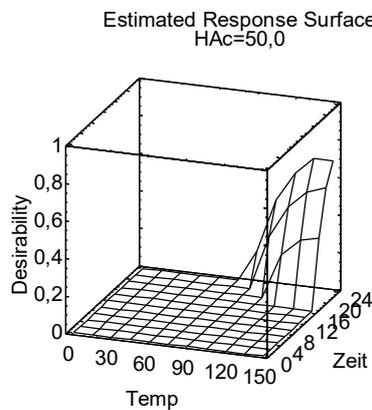


Abbildung 6. Berechnete Wirkungsfläche.

Das so ermittelte Optimum lag bei einem Anteil von 49 % Essigsäure, einer Reaktionsdauer von 23,8 h und einer Reaktionstemperatur von 150 °C. Zwar war zu erwarten, dass eine Erhöhung der Temperatur eine zusätzliche Verbesserung der Ausbeute bedingen würde, allerdings sind höhere Temperaturen kaum anwendbar. Der Siedepunkt von Essigsäure liegt bei 118 °C, was bedeutet, dass die katalytische Umwandlung ab dieser Temperatur nicht mehr drucklos durchzuführen ist.

Um die Anwendbarkeit der Modellberechnung zu bestätigen, wurde der Ansatz mit den errechneten Bedingungen mehrmals durchgeführt und ausgewertet. Die berechneten Werte stimmen gut mit den ermittelten Werten überein (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4. Vergleich von berechnetem und gemessenem Optimum der Umwandlungsreaktion.

	IX [mg/mL]	IXA [mg/mL]	XN [mg/mL]	XA [mg/mL]
Optimum berechnet	0,0017	0,0598	0,0000	0,0316
Optimum gemessen (Mittelwert)	0,0000	0,0504	0,0000	0,0232
Standardabweichung	0,0000	0,0020	0,0000	0,0006
proz. Fehler		4,00 %		2,39 %
Verhältnis gemessen/errechnet	-	0,84	-	0,73

Man erkennt in Tabelle 4, dass sowohl im Modell, wie auch in der experimentellen Überprüfung das gesamte Xanthohumol umgesetzt wurde. Dies legt nahe, dass sich Xanthohumol entweder in eines der Reaktionsprodukte umgewandelt hat oder es sich durch die Temperatureinwirkung zersetzt hat. Obwohl im Fall von Isoxanthohumol eine Konzentration von 0,0017 mg/mL errechnet wurde, konnte aufgrund der Nachweisgrenze kein Isoxanthohumol in den drei experimentellen Proben bestimmt werden. Im Fall von Xanthohumol A sowie Isoxanthohumol A stimmten die errechnete Wert mit 73 % und 85 % gut überein.

4.1.3.2 Katalytische Umsetzung der Treber am errechneten Optimum

Im nächsten Schritt wurden die durch die statistische Versuchsplanung ermittelten Reaktionsparameter direkt auf den CO₂-Treber angewandt. Es zeigte sich, dass nicht annähernd die vorher berechneten Gehalte an Xanthohumol A in der Reaktionslösung erreicht werden konnten. Zusätzlich war der Gehalt an Isoxanthohumol A höher als jener des gewünschten Produktes, das war aufgrund der sehr erfolgreichen Versuche mit Reinsubstanzen verwunderlich. Durch Extraktion der Treber nach der katalytischen Umsetzung mit Lösungsmittel konnte gezeigt werden, dass ein großer Teil des gewünschten Reaktionsproduktes im Treber verblieb und somit die Einführung eines Extraktionsschrittes notwendig war.

4.1.3.3 Optimierung der Extraktion

Folglich wurde im nächsten Schritt die Extraktion der Treber optimiert. Hierzu wurde zunächst wieder Xanthohumol und die unbehandelten Treber eingesetzt. Es wurden unter anderem Methanol, Ethanol, Methanol-Wasser-Gemische, Ethanol-Wasser-Gemische, aber auch Natronlauge und Essigsäure als Lösungsmittel eingesetzt. Die Versuche wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die höchsten Gehalte an Xanthohumol konnte mit einem Ethanol-Wasser-Gemisch (80:20) extrahiert werden (Abbildung 7).

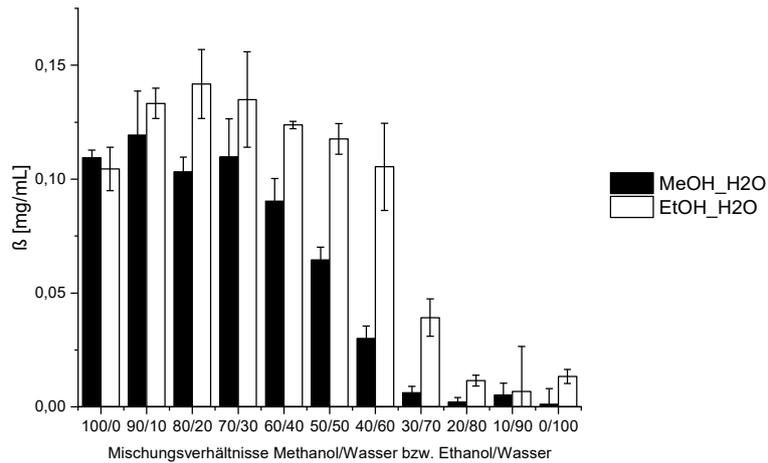


Abbildung 7. Extraktionen mit Methanol-Wasser bzw. Ethanol-Wasser-Gemischen.

Die Extraktionen mit Natronlauge lieferten keine reproduzierbaren Ergebnisse. Bei der Extraktion mit Essigsäure (50 %) können bei Raumtemperatur im Vergleich zur Ethanol-Wasser (80:20)-Extraktion nur etwa 76 % der Menge an Xanthohumol extrahiert werden. Es zeigen sich jedoch bereits bei Raumtemperatur Spuren von Xanthohumol A.

Anschließend wurde die maximal einsetzbare Masse an Treber in einer bestimmten Lösungsmittelmenge bestimmt, um die Kosten und Menge des Lösungsmittels gering zu halten. Hierzu wurden verschiedene Trebermengen mit der gleichen Menge Lösungsmittel (Ethanol:Wasser 80:20) für 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

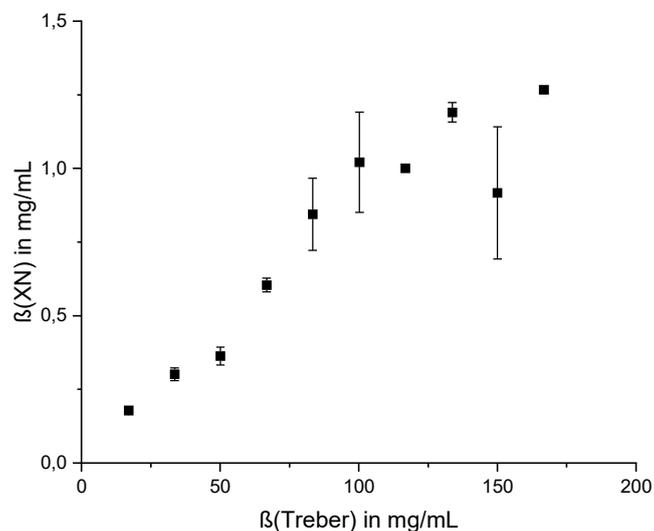


Abbildung 8. Ermittlung des maximalen Verhältnisses von Treber zu Lösungsmittel.

Bis zu einem Treber-Wert von 100 mg/mL steigt die Menge an extrahiertem Xanthohumol A kontinuierlich an und geht anschließend in die Sättigung über (Abbildung 8), so dass als optimiertes Verhältnis von Treber/ Lösungsmittel 1:10 (w/v) angegeben werden kann.

Als nächster Parameter wurde die Extraktionszeit untersucht. Die Untersuchung von 3 Stunden bis 24 Stunden Extraktionszeit lieferte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Xanthohumol Gehalte. Überraschend war, dass auch unter 3 Stunden kein signifikanter Unterschied in den extrahierten

Gehalten an Xanthohumol A festgestellt werden konnte (Abbildung 9). Eine Extraktionszeit von 15 Minuten bei Raumtemperatur erscheint als ausreichend.

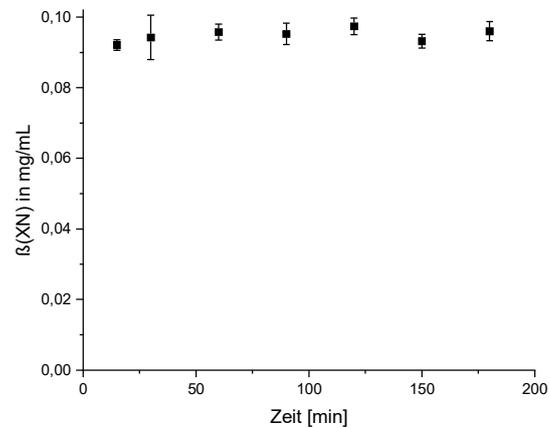


Abbildung 9. Einfluss der Zeit auf die Menge an extrahierbarem Xanthohumol.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob eine Erhöhung der Ausbeute durch Temperaturerhöhung ermöglicht wird. Auch durch eine Temperaturerhöhung bis zu 60 °C kann nicht mehr Xanthohumol A aus dem Treber extrahiert werden (Abbildung 10).

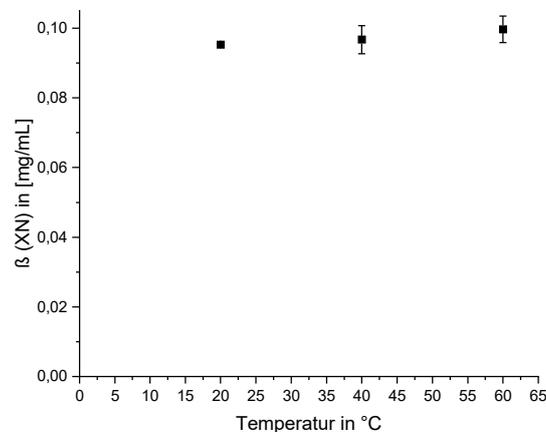


Abbildung 10. Einfluss der Temperatur auf die Extraktionsmenge an Xanthohumol.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Extraktion mit einem Gemisch aus Ethanol und Wasser im Verhältnis 80 zu 20, bei Raumtemperatur und einer Dauer von 15 Minuten durchgeführt werden kann.

Im Anschluss wurden unterschiedliche katalytische Umwandlungen durchgeführt, welche das Ziel hatten mittels unterschiedlicher Vorbehandlung oder Extraktionsbedingungen den Gehalt des neuroprotektiven Xanthohumol A (XA) ausgehend von der Umwandlung von Xanthohumol im Treber oder Extrakt zu steigern. Ein Übersichtsschema über die Versuche mit Treber und Extrakt ist in Abbildung 11 dargestellt.

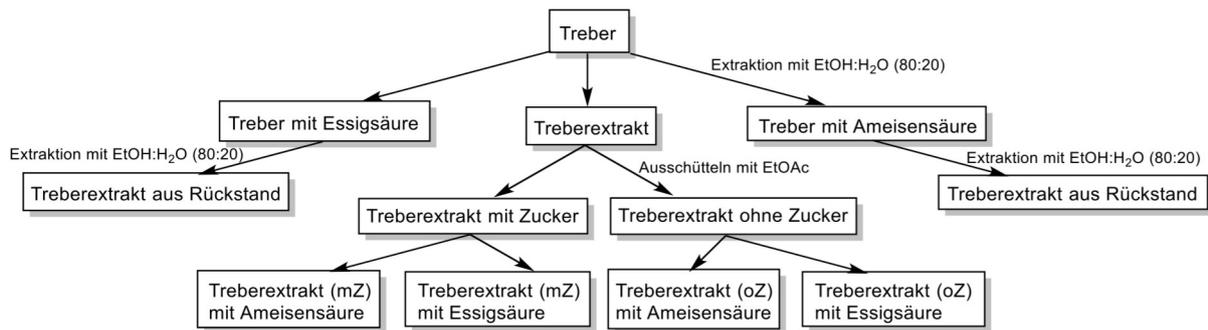


Abbildung 11. Übersicht über die Versuche mit Treber und Extrakt.

Zunächst wurde der Treber mit Ethanol:H₂O (80:20) extrahiert und ein Teil des Extraktes (bezeichnet als mZ) wurde einer flüssig-flüssig-Extraktion mit Ethylacetat und Wasser unterzogen, um wasserlösliche Komponenten wie Zucker zu entfernen (bezeichnet als oZ: ohne Zucker). Anschließend wurden beide Extrakte für die Umsetzungen mit Ameisensäure und Essigsäure verwendet. Auch Treber der vorher nicht extrahiert wurde, wurde mit Ameisensäure und Essigsäure versetzt. Bei diesen Versuchen wurde der bei der Umsetzung zurückbleibende Feststoff im Anschluss mit Ethanol-Wasser (80:20) extrahiert und als zusätzliche Probe weiter untersucht.

Der wässrig/ethanolische Extrakt der Treber weist einen Gehalt an Xanthohumol von ca. 6 % auf. Zurückgerechnet auf die eingesetzte Masse der Treber ergibt sich ein Gehalt von ca. 1 %. Durch die flüssig-flüssig-Extraktion konnte der Gehalt an Xanthohumol auf ca. 13 % angehoben werden. Rückgerechnet auf die eingesetzte Masse der Treber ergibt sich ein Gehalt von ca. 1 %, was den Schluss zulässt, dass die prenylierten Flavonoide fast vollständig in die organische Phase übergingen.

Einen hohen Gehalt an Xanthohumol A in Bezug auf die Treber erhält man durch Umsetzung mit Ameisensäure (100 %) und anschließender Extraktion des Rückstandes. Die Umsetzung des Treberextraktes (sowohl mit als auch ohne Zucker) mit Ameisensäure lieferte weniger Xanthohumol A in Bezug auf die eingesetzte Trebermasse (Abbildung 12).

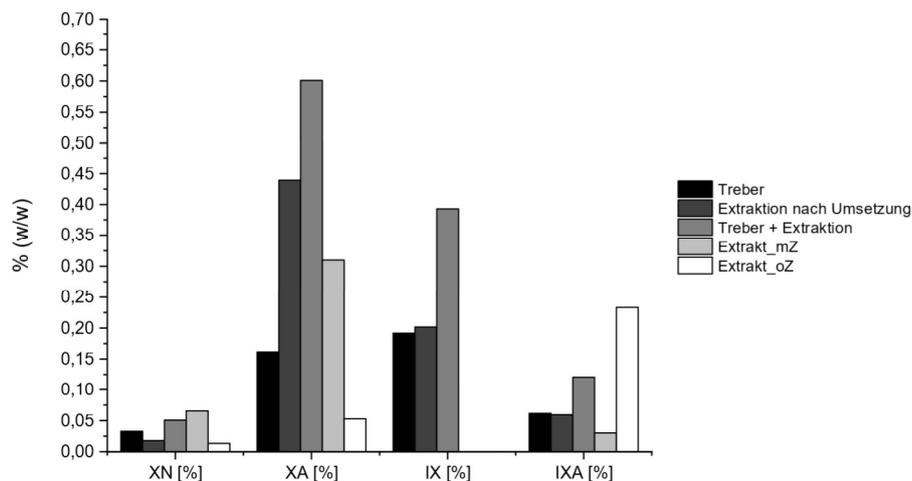


Abbildung 12. Umsetzung der Treber mit Ameisensäure (100 %) in der Mikrowelle und anschließender Extraktion des Rückstandes mit EtOH:H₂O (80:20) im Vergleich zur Umsetzung der Treberextrakte.

Der höchste Gehalt an Xanthohumol A in Bezug auf den Extrakt ergibt sich in der Umsetzung der Treber mit Essigsäure (50 %, 150 °C) und der Extraktion des Rückstandes zu 2,89 %. Allerdings muss hier

angemerkt werden, dass auch Isoxanthohumol A zu 3,05 % des Extraktes beiträgt. Die Umsetzungen von Extrakten mit Essigsäure lieferten grundsätzlich höhere Anteile an Isoxanthohumol A. Dieses Pyranoflavanon weist eine höhere Differenzierungsinduktion als das prenylierte Flavone auf, allerdings auch wesentlich geringer als Xanthohumol A (Urmann et al. 2021). Anders verhielt es sich bei Anwendung von Ameisensäure, welche zu höheren Anteilen Xanthohumol A führte.

Der Gehalt bezogen auf den Extrakt gibt keinen Hinweis auf die tatsächliche Ausbeute, die Wirkung im Zellassay ist allerdings nicht von der Ausbeute abhängig, sondern vom Gehalt der Wirksubstanzen im getesteten Extrakt.

Zur Aufarbeitung wurden die umgesetzten Proben mit Ethylacetat aus der Säure extrahiert und anschließend im untersuchten cyclodextrin-unterstützten Filtrationsverfahren fraktioniert (Arbeitspaket 2).

4.2 Arbeitspaket 2: Parameteranpassung

Ziel des Arbeitspaketes 2 war die Anpassung der Parameter für das Cyclodextrin-basierte Extraktionsverfahren. Das Verfahren wurde auf Xanthohumol C optimiert, welches sich strukturell vom Produkt der säurekatalytischen Umsetzung Xanthohumol A durch die Anwesenheit einer Doppelbindung im Pyranoring unterscheidet.

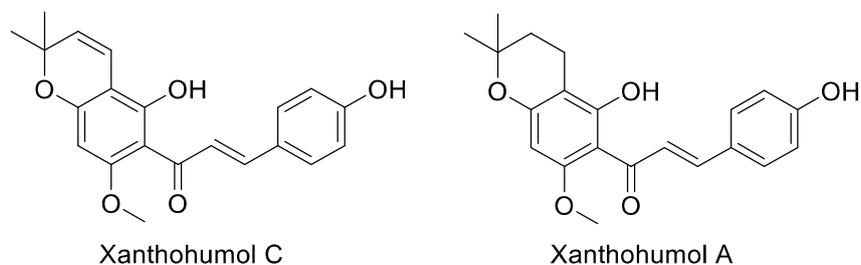


Abbildung 13. Strukturen von Xanthohumol C und Xanthohumol A.

Dementsprechend musste überprüft werden, ob das Verfahren an die neue Zielstruktur angepasst werden musste, bevor im Anschluss mittels des Cyclodextrin-basierten Filtrations-Verfahrens die Extrakte für die Bioaktivitätsuntersuchungen in Arbeitspaket 3 hergestellt werden konnten.

Das Verhalten von Xanthohumol A wurde im Modellsystem der Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht. Als Trägermaterial für die cyclodextrin-unterstützte Extraktion kann sowohl PA wie auch PVPP verwendet werden. Der Vorteil von PVPP liegt in der bereits vorliegenden Lebensmittelzulassung. Da Platten für die Dünnschichtchromatografie aus PVPP nicht käuflich zu erwerben sind, wurde die Platten selbst hergestellt. Hierzu wurde das PVPP Material mit handelsüblichem Gips als Bindemittel und Fluoreszenzindikator versetzt und mittels Streichmethode auf Glasplatten aufgebracht. Nach dem Trocknen wurden die Substanzen mittels Glaskapillaren aufgebracht und als Laufmittel unterschiedliche Cyclodextrine in unterschiedlicher Konzentration verwendet. Zur Auswertung der DC-Platten wurden die Retentionswerte, auch R_f-Werte genannt, herangezogen. Dazu wurden die von den Analyten und der Lösungsmittelfront zurückgelegten Strecken gemessen. Der R_f-Wert wird berechnet, indem die von der Substanz zurückgelegte Strecke durch den Abstand von der Startlinie zur Lösungsmittelfront geteilt wird. Die Detektion der Substanzen erfolgte visuell unter Tageslicht sowie unter UV-Licht der Wellenlängen 254 nm und 366 nm. Xanthohumol und Xanthohumol A waren als gelbe Punkte unter Tageslicht sichtbar. Isoxanthohumol und Isoxanthohumol C welche als Nebenprodukte der katalytischen Umwandlung entstehen konnten, zeigten Fluoreszenz unter UV-Licht. In Abbildung 14

sind die R_f-Werte der untersuchten Substanzen in Abhängigkeit der Cyclodextrinkonzentration dargestellt. Es zeigte sich ein Anstieg der R_f-Werte der untersuchten Substanzen.

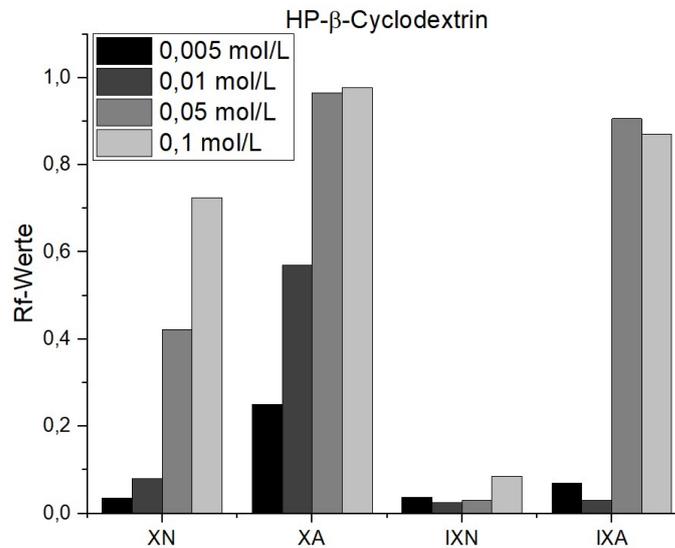


Abbildung 14. Konzentrationsabhängige R_f-Werte nach Substanzen nach TLC mit HP-β-Cyclodextrin als mobile Phase.

Wie auch bei anderen Prenylflavonoiden gezeigt, verursacht der Zusatz von Me-β-Cyclodextrin höhere R_f-Werte als der Zusatz von HP-β-Cyclodextrin. Ebenso zeigen sich höhere R_f-Werte bei den Substanzen mit ringgeschlossener Seitenkette, als mit offener Prenylkette. Ein Vergleich mit den ermittelten Parametern für Xanthohumol C, zeigt, dass im Falle von Xanthohumol A geringere Cyclodextrin-Konzentrationen möglich werden, ansonsten sind keine Unterschiede festzustellen. Dementsprechend war keine weitere Parameteranpassung notwendig.

Die in Arbeitspaket 1 hergestellten Extrakte wurden anschließend mittels des Cyclodextrin-basierten Filtrationsverfahrens aufgereinigt. Hierzu wurden die Extrakte in geeignetem Lösungsmittel auf die fünffache Menge an PA/PVPP gegeben und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Anschließend wurde das Trägermaterial sukzessive mit Wasser, HP-α-Cyclodextrinlösung, HP-γ-Cyclodextrinlösung, HP-β-Cyclodextrinlösung und MeOH gewaschen. Die Gehalte an Referenzsubstanzen jedes Waschschrilles wurden mit der in Arbeitspaket 1 evaluierten HPLC-Methode bestimmt (Abbildung 15) und die Extrakte in Arbeitspaket 3 getestet.

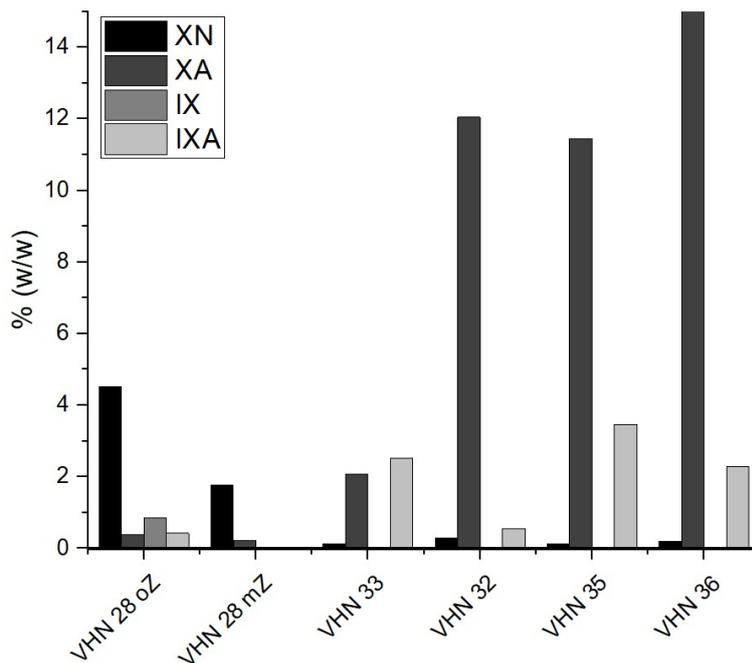


Abbildung 15. % (w/w) der Substanzen Xanthohumol (XN), Xanthohumol A (XA), Isoxanthohumol (IX) und Isoxanthohumol A (IXA) in den unterschiedlichen HP-β-Cyclodextrin Fraktionen.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Cyclodextrin-basierte Verfahren ohne nennenswerte Parameteranpassung auf die katalytisch umgesetzten Extrakte anwendbar war und wie erwartet die höchsten Gehalte an Xanthohumol A in den mit HP-β-Cyclodextrin gewonnenen Fraktionen zu finden waren.

4.3 Arbeitspaket 3: Zellversuche

Die Wirkung pflanzlicher Arzneiprodukte wird entscheidend durch den Herstellungsprozess beeinflusst. Ziel des Arbeitspaketes war es, das Potential der hergestellten Referenzsubstanzen und Extrakte bezüglich Neuroprotektion und Neuroregeneration zu ermitteln.

Zu den untersuchten Referenzsubstanzen zählen die Hopfenflavonoide Xanthohumol, Xanthohumol A und Xanthohumol C, als auch Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A und Isoxanthohumol C. Außerdem wurden auch verschiedene Extrakte, die aus einem Hopfentreiber gewonnen wurden und weitere Prenylflavonoide des Hopfens wie 8-Prenylnaringenin, 6-Prenylnaringenin, 8-Geranylnaringenin auf ihre Wirkung getestet.

Grundsätzlich unterscheiden sich die Referenzsubstanzen, wie in Abbildung 16 beispielhaft am Xanthohumol C und Isoxanthohumol C dargestellt, vor allem am Ringschluss. Sie können deshalb eingeteilt werden in Verbindungen mit einem Chalkon-Gerüst und Verbindungen mit einem Flavanon-Gerüst. Zu den Chalkonen zählen Xanthohumol, Xanthohumol A und Xanthohumol C. Die anderen Referenzsubstanzen wie Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A und Isoxanthohumol C können zu den Flavanonen zugeordnet werden.

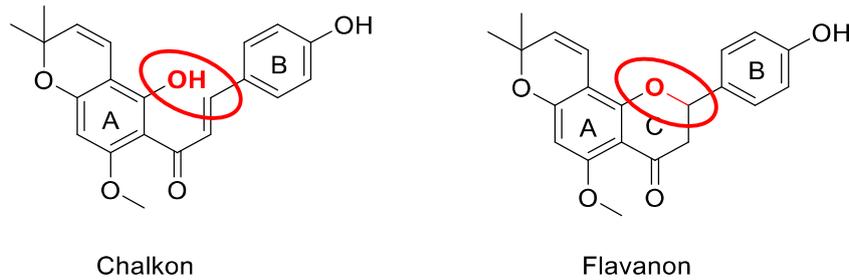


Abbildung 16. Chemische Struktur eines Chalkons und Flavanons am Beispiel Xanthohumol C und Isoxanthohumol C. Der Ringschluss ist mit rotem Kreis angedeutet.

Als Modellierung der unterschiedlichen pathologischen Vorgänge, die sich im Laufe von degenerativen Erkrankungen abspielen können, wurden *in vitro* Testsysteme entwickelt, die zur Analyse möglicher neuroprotektiver Effekte der Hopfenflavonoide und Extrakte verwendet wurden. Um das Potential der Extrakte und Referenzsubstanzen zur Behandlung oder Vorbeugung von neurodegenerativen Erkrankungen zu testen, wurden unterschiedliche *in vitro* Versuche basierend auf dem neuronalen Zellmodell SH-SY5Y verwendet. Dieses Zellmodell stammt aus einem Neuroblastom eines 4-jährigen Mädchens und ist ein weitverbreitetes Werkzeug zur Analyse von degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder auch Ischämie (Biedler et al. 1978).

Zunächst wurde der Einfluss der zu testenden Substanzen und Extrakte auf die Zellviabilität untersucht, da eine protektive Wirkung nur nachgewiesen werden kann, wenn die Zellen nicht schon durch die zu testenden Proben geschädigt werden. Im Anschluss wurde die protektive Aktivität untersucht. Dazu wurden chemische Substanzen als Auslöser degenerativer Vorgänge, wie beispielsweise oxidativer Stress oder Hypoxie genutzt.

Die in Arbeitspaket 1 erhaltenen Extrakte wurden im Anschluss auf mögliche Interaktion mit dem Detektionsenzym Luciferase getestet, um dann ihre Differenzierungs-induzierende/neuroregenerative Aktivität in einem dualen Luciferase-Assay in Vorderhirnzellen der Maus festzustellen.

4.2.1 Bestimmung des Einflusses auf die Zellviabilität der Referenzsubstanzen

Für die Analyse der Zellviabilität wurden verschiedene *Readouts*, den so genannten Viabilitäts-Assays identifiziert, mit denen eine Evaluierung des protektiven Effekts basierend auf der Überlebensrate der Zellen ermöglicht werden konnte. Insofern keine Interaktionen mit den jeweiligen Viabilitätsassays festgestellt werden konnte, wurden alle Substanzen bzgl. ihres Effekts auf die Zellviabilität auf SH-SY5Y Zellen getestet.

Für die Analyse des Einflusses der Extrakte und Referenzsubstanzen auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen wurde die halbmaximale Konzentration (IC_{50}) ermittelt, die bei Behandlung eine Reduzierung der Überlebensrate der Zellen auf 50 % induzierte. Die Analyse der IC_{50} Werte basierte auf den Leitlinien zur Ermittlung akkurater EC_{50}/IC_{50} Analyse von Sebaugh (2011). Zur Berechnung des IC_{50} wurde das Programm *OriginLab* genutzt, dessen Berechnungsgrundlage auf folgender Gleichung (1) beruht:

$$(1) \quad IC_{50} = \text{Minimum Testsubstanz} + \frac{(A2-A1)}{(1 + 10^{(\text{LOG}_{x0}-x)p})}$$

A1: Minimum Testsubstanz

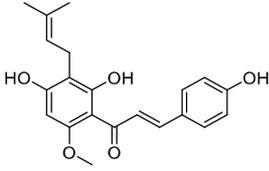
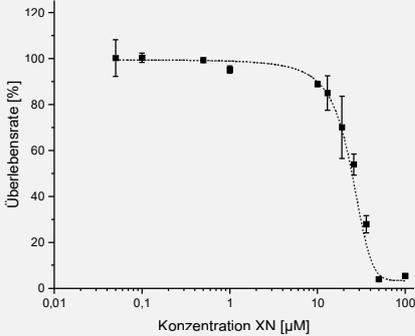
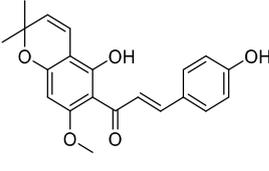
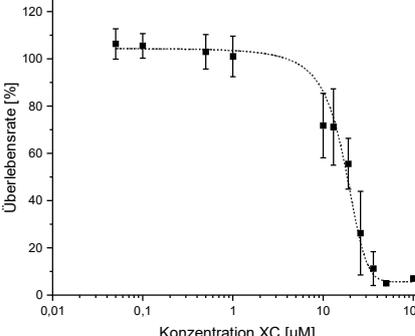
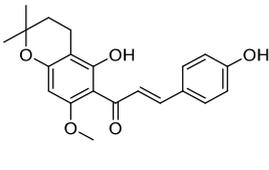
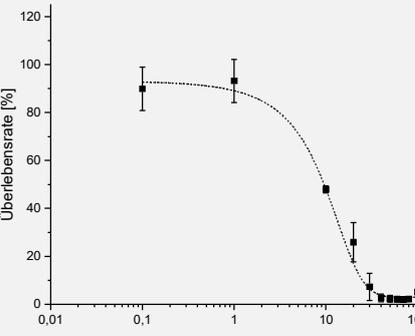
A2: Maximum Testsubstanz

LOG_{x0} : Zentrum der Kurve, Konzentration, die halbmaximalen Überlebensrate induziert

p: Steigung

Da -physiologisch gesehen- vor allem Konzentrationen von 0 bis zu 100 μM sinnvoll für die Anwendung im Menschen sind, wurden die unterschiedlichen Referenzsubstanzen auf ihre zytotoxische Wirkung innerhalb einer Konzentrationsspanne von 0-100 μM getestet.

Tabelle 5. Effekte von Xanthohumol, Xanthohumol A, und Xanthohumol C auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).

Chalkone	Dose-Response-Kurve	IC ₅₀ [μM]
 <p>Xanthohumol</p>		20,43 ± 2,21 μM
 <p>Xanthohumol C</p>		17,7 ± 1,85 μM
 <p>Xanthohumol A</p>		10,14 ± 0,72 μM

Die Analyse des Einflusses auf die Zellviabilität der Chalkone Xanthohumol, Xanthohumol A und Xanthohumol C auf SH-SY5Y Zellen zeigte bei allen drei Substanzen eine dosisabhängige Reduzierung der Viabilität (Tabelle 5).

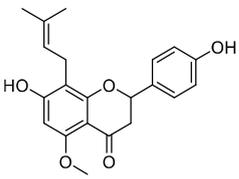
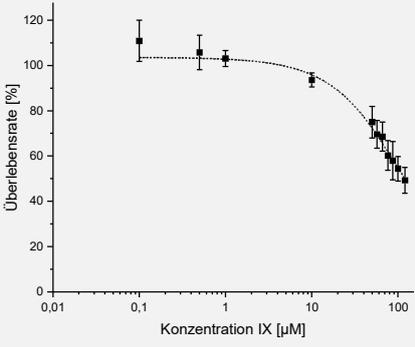
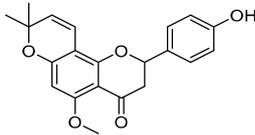
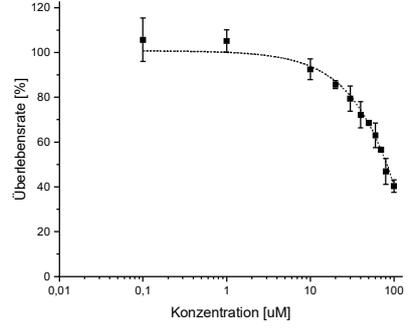
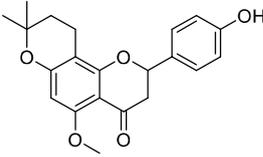
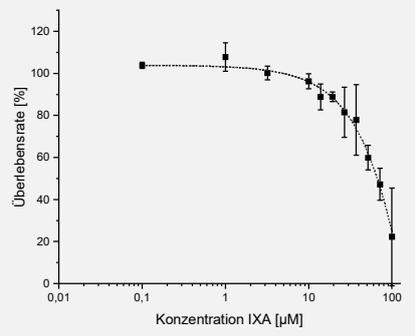
Die ermittelten IC₅₀-Werte lagen bei einer Konzentration von 20,43 ± 2,21 μM für Xanthohumol, 17,7 ± 1,85 μM für Xanthohumol C und 10,14 ± 0,72 μM für Xanthohumol A (Tabelle 5).

Der Vergleich der IC₅₀ Konzentrationen von Xanthohumol C (XC) und Xanthohumol A (XA) zeigt, dass die An- oder Abwesenheit der Doppelbindung im Pyrano-Ring einen erheblichen Einfluss auf die zytotoxische Wirkung der Chalkone hat. Die Auswirkung der offenen oder geschlossenen Prenylgruppe

am A-Ring auf die zytotoxische Wirkung der Flavonoide ist geringer, da die beiden IC₅₀ Konzentrationen relativ nahe beieinanderliegen.

Die Evaluierung von Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A ergab ebenfalls eine dosisabhängige Senkung der Überlebensrate von SH-SY5Y Zellen. Allerdings war keine der drei Substanzen innerhalb der getesteten Konzentrationsrange (c = 0 - 100 µM) in der Lage, die Viabilität der Zellen auf 0 % zu reduzieren. Dementsprechend konnte kein genauer IC₅₀ berechnet werden (Tabelle 6).

Tabelle 6. Effekte von Isoxanthohumol, Isoxanthohumol A, und Isoxanthohumol C auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).

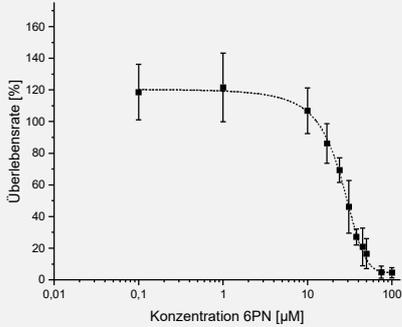
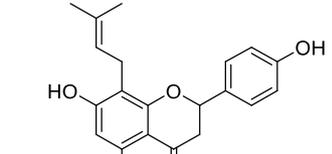
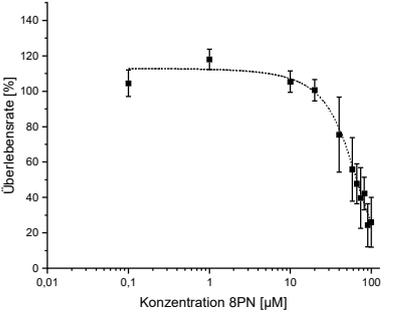
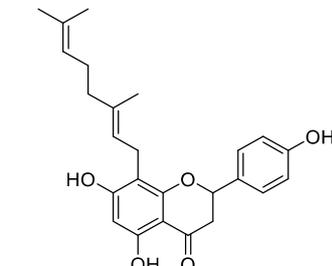
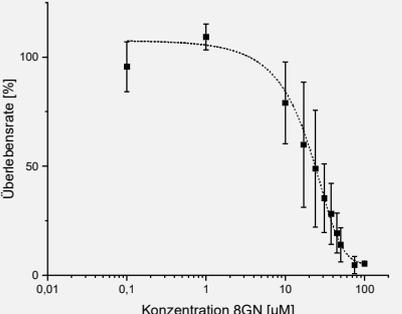
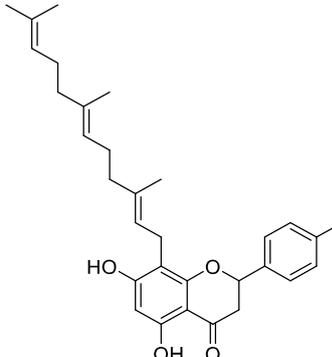
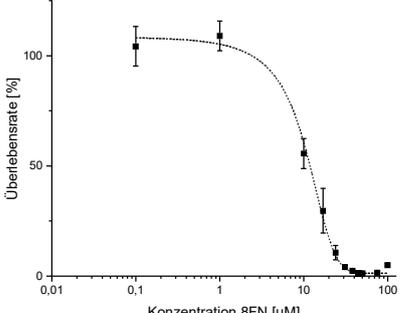
Flavanone	Dose-Response-Kurve	IC ₅₀ [µM]
 <p>Isoxanthohumol</p>		> 50 µM
 <p>Isoxanthohumol C</p>		> 50 µM
 <p>Isoxanthohumol A</p>		> 50 µM

Eine weitere Verbindungsklasse, die immer mehr Aufmerksamkeit in der Forschung findet, sind prenylierte Flavonoide. Von besonderem Interesse sind die prenylierten Flavanoide, da sie zu der zweithäufigsten Klasse prenylierter Flavonoide mit anti-oxidativer Wirkung gehören (Santos und Silva 2020). Bekannte Vertreter prenylierter Flavanoide des Hopfens sind die beiden Flavanoide 6- und 8-Prenylnaringenin. Neben ihrer großen Bandbreite an vielfältigen gesundheitsfördernden Wirkungen, ist

8-Prenylnaringenin vor allem als „Phytoöstrogen“ des Hopfens bekannt (Miranda et al. 1999), Diller et al. 2007). Aufgrund des großen Potentials für neuroprotektive oder neuroregenerative Effekte dieser Substanzklasse, wurde neben den Referenzsubstanzen auch noch 6- und 8-Prenylnaringenin und 8-Geranylnaringenin untersucht. Um mehr Informationen über die Konsequenzen der Prenylierung von Flavanonen zu erfahren, wurde auch das oben beschriebene synthetisierte prenylierte Flavanone 8-Farnesylnaringenin auf anti-oxidative Wirkung untersucht.

Die Behandlung der SH-SY5Y Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der prenylierten Flavonoide ergab für alle Substanzen einen dosisabhängigen Effekt auf die Zellviabilität. Die errechneten IC₅₀-Werte sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7. Effekte von 6-Prenylnaringenin und 8-Prenylnaringenin auf die Zellviabilität der Neuroblastoma Zelllinie SH-SY5Y. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) nach 24 h Behandlung. Die Überlebensrate wurde mit dem CellTiterGlo-Assay bestimmt (n=3).

Flavanone	Dosis-Reaktionskurve	IC50 [μM]
 <p data-bbox="276 685 504 712">6-Prenylnaringenin</p>		26,13 ± 0,87 μM
 <p data-bbox="276 1070 504 1097">8-Prenylnaringenin</p>		57,41 ± 4,14 μM
 <p data-bbox="276 1536 504 1563">8-Geranyl naringenin</p>		19,79 ± 2,48 μM
 <p data-bbox="276 1977 504 2004">8-Farnesyl naringenin</p>		10,78 ± 2,35 μM

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass der Effekt auf die Zellviabilität der getesteten Substanzen im Zusammenhang mit ihrem chemischen Aufbau steht. So konnte gezeigt werden, dass der Effekt der Chalkone weniger vom Ringschluss der Prenylgruppe am A-Ring, als von der Anwesenheit der Doppelbindungen des am A-Ring entstandenen Heterozyklus abhängt. Auch ein Vergleich der IC₅₀-Konzentrationen der verschiedenen Chalkone mit denen der Flavanone Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A zeigte einen deutlich stärkeren Effekt der Chalkone, (Abbildung 16). Dass Isoxanthohumol einen geringeren Effekt als Xanthohumol hat, wurde auch schon von Miranda et al.(1999) an einer Reihe an unterschiedlichen humanen Zelllinien wie beispielsweise MCF-7 (Brustkrebszellen) oder an HAT-29 (Kolonkrebszellen) gezeigt (Miranda et al. 1999).

Die Analyse der Auswirkung der Prenylierung, bzw. der Verlängerung der Prenylseitenkette von Flavanonen, zeigte einen erheblichen Effekt der Flavanone. Während die Substitution einer Prenylgruppe an Position C-8 des A-Rings nur einen geringen Effekt auf die Zellviabilität der SH-SY5Y Zellen auslöste, hatte die Anwesenheit einer Prenylgruppe an C-6 einen deutlich stärkeren reduzierenden Effekt auf die Überlebensrate. Darüber hinaus konnte bei der Analyse der IC₅₀-Werte von 8-Prenylnaringenin (8PN), 8-Geranylaringenin (8GN), und 8-Farnesylaringenin (8FN) festgestellt werden, dass mit der Verlängerung der Prenylseitenkette, auch der Effekt auf die Zellviabilität der SH-SY5Y Zellen steigt. Dass die Prenylierung am C-8 Atom des A-Rings einen starken Effekt auf die Zellviabilität hat, konnte auch bereits am Beispiel des Apigenins gezeigt werden (Diller et al. 2007; Wätjen et al. 2007).

4.2.2 Untersuchung der Schutzwirkung auf Degenerationseinflüsse der Referenzsubstanzen und Extrakte

Für die Untersuchung der Schutzwirkung gegen neuronale Degenerationseinflüsse von Extrakten und Referenzsubstanzen, wurden unterschiedliche *in vitro* Testsysteme entwickelt. Im Rahmen des *in vitro* Testsystems, wurde durch eine Behandlung mit verschiedenen chemischen Substanzen ein neuronaler degenerativer Prozess induziert, der das schnelle Absterben der SH-SY5Y Zellen verursachte. Eine präventive Schutzwirkung gegen diese Behandlungen wurde untersucht, indem die Zellen vier Stunden vor der schädlichen Intervention mit den Testsubstanzen behandelt wurden und nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden die Zellviabilität überprüft wurde.

4.2.2.1 Hypoxie

Hypoxie wird definiert als Sauerstoffmangel im Blut oder in speziellen Gewebereichen des menschlichen Körpers. Zu den wohl bekanntesten Ereignissen, die eine Hypoxie auslösen können, zählt ein Schlaganfall. Durch eine verminderte Durchblutung sinkt nach und nach der für die Zellen überlebenswichtige Sauerstoffgehalt im Gewebe, der zum Absterben der Zellen führt (Peers et al. 2009).

Die Behandlung mit Cobaltchlorid (CoCl₂) *in vitro* ist in der Literatur als Hypoxie auslösend beschrieben. Der zugrundeliegende Mechanismus ist auf die Induktion des Hypoxie-induzierten-Faktors 1 α (HIF-1 α), reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Onkogenen zurückzuführen (Stenger et al. 2011). Deshalb wurde CoCl₂ verwendet, um eine Zellschädigung durch Hypoxie der SH-SY5Y Zellen herbeizuführen. Als geeignete Konzentration für eine ausreichende Schädigung der Zellen, wurde der IC₅₀ als Behandlungskonzentration festgelegt. Der für CoCl₂ ermittelte IC₅₀ war 176,9 \pm 11,81 μ M (Abbildung 17.; A). Da N-Acetylcystein (NAC) bei einer Konzentration von 1 mM das Absterben der Zellen durch die CoCl₂ Behandlung verhindern konnte, wurde es als Positivkontrolle für alle weiteren Versuche verwendet (Abbildung 17.; B).

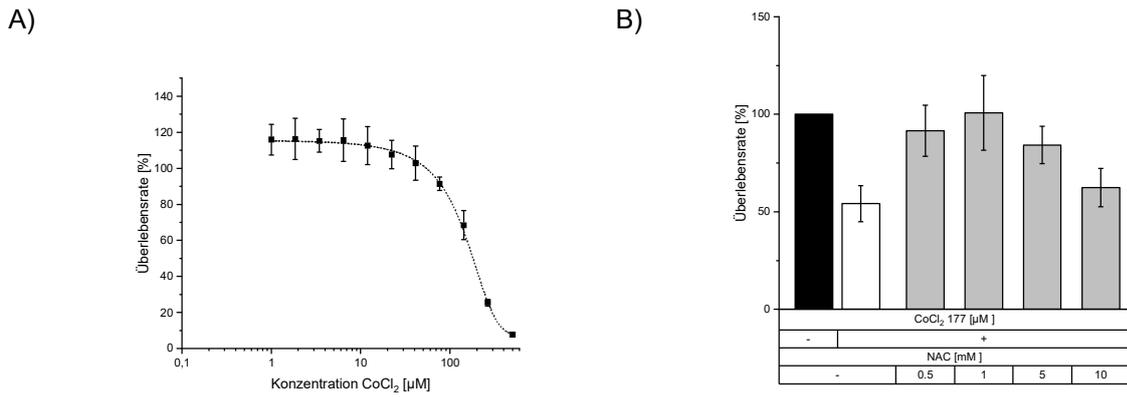


Abbildung 17. (A) Zytotoxizität unterschiedlicher Konzentrationen CoCl_2 auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (B) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen CoCl_2 induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

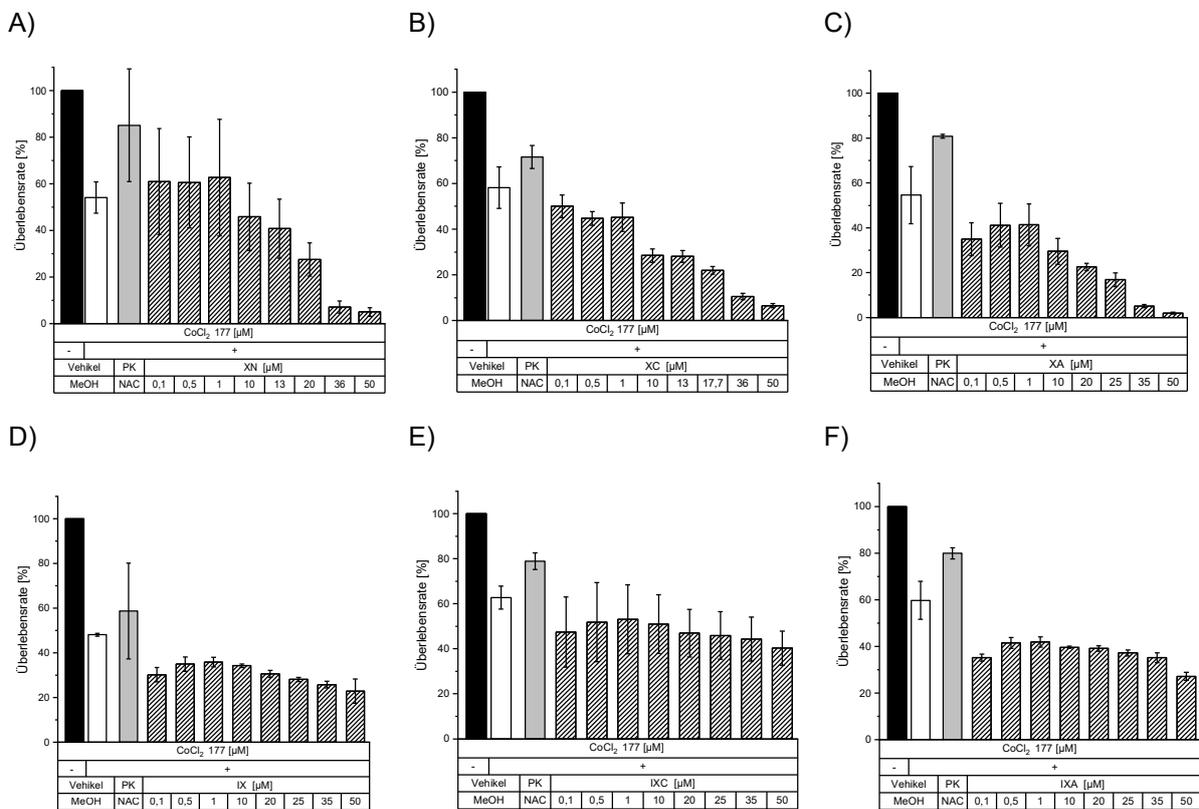


Abbildung 18. Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B) und Xanthohumol A (C) sowie Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen CoCl_2 induzierte Hypoxie. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 1 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 177 μM CoCl_2 behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Die Untersuchung eines neuroprotektiven Effekts von Xanthohumol, Xanthohumol C und Xanthohumol A gegen eine CoCl_2 induzierte Hypoxie ergab keinen neuroprotektiven Effekt der getesteten Referenzsubstanzen. Auch Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A

zeigten keinen neuroprotektiven Effekt gegen eine CoCl_2 induzierte Hypoxie (Abbildung 18). Allerdings konnte bei den drei Chalkonen ab einer Konzentration von circa $10 \mu\text{M}$ eine zusätzliche Reduzierung der Überlebensrate festgestellt werden (Abbildung 18 A; B; C) und für die Flavanone geringere Effekte auf die SH-SY5Y Zellen nach Ringschluss (Abbildung 18 D; E; F). Dies steht mit den Ergebnissen der IC_{50} Ermittlungen im Einklang.

Neben den Chalkonen und Flavanonen wurden zusätzlich auch die Gruppe der prenylierten Flavonoide getestet. Weder 6- noch 8-Prenylnaringenin waren in der Lage das Absterben der Zellen zu verhindern und konnten keinen neuroprotektiven Effekt gegen CoCl_2 induzierte Hypoxie auslösen (Abbildung 19).

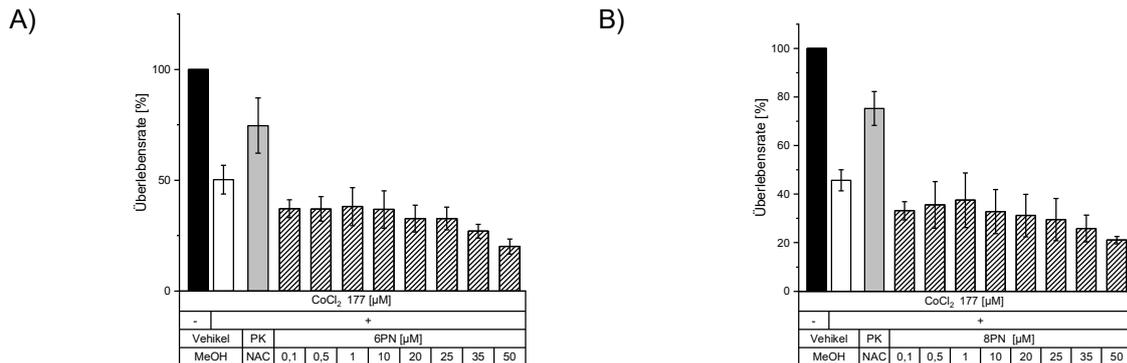


Abbildung 19. Neuroprotektiver Effekt von 6- und 8-Prenylnaringenin (A; B) gegen CoCl_2 induzierte Hypoxie. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 1 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit $177 \mu\text{M}$ CoCl_2 behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle ($n=3$).

4.2.2.2 Oxidativer Stress - ROS

Unter oxidativem Stress versteht man ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) (Tinker und Michenfelder 1976; Zhang et al. 2007). ROS entstehen täglich zu hunderttausenden im menschlichen Körper beim Übergang von O_2 zu H_2O und sind Peroxid-verwandte, radikalartige Zwischenprodukte, können aber über Antioxidantien und verschiedene anti-oxidative Enzymsysteme, wie Peroxidase und Superoxiddismutase, teilweise abgefangen werden. Die exzessive Entstehung von ROS ist die Ursache vieler verschiedener Krankheiten, weshalb es von besonderer Wichtigkeit ist, das empfindliche Gleichgewicht zwischen der Entstehung und dem Abbau zu erhalten. Zur Erforschung von oxidativem Stress und anti-oxidativen Substanzen können *in vitro* Modelle wie beispielsweise Zellmodelle genutzt werden, die über eine Behandlung mit unterschiedlichen Chemikalien künstlich oxidativen Stress ausgesetzt werden. Für die Behandlung eignen sich beispielsweise Peroxide und Natriumnitroprussid (SNP), die in der Lage sind, die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu induzieren. H_2O_2 selbst zählt zu den ROS, während SNP einen Anstieg von Stickstoffmonoxid (NO) verursacht.

Auch dabei wurde im Rahmen der Entwicklung wieder die IC_{50} Konzentration der oxidativen Stress-induzierenden Substanzen als geeignete Konzentration für eine ausreichende Zellschädigung verwendet. Die Untersuchung des IC_{50} von H_2O_2 zeigte eine dosisabhängige Senkung der Überlebensrate von SH-SY5Y Zellen nach einer 24 Stunden Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von H_2O_2 . Der errechnete absolute IC_{50} lag bei $170,54 \pm 65,67 \mu\text{M}$ (Abbildung 20; A). Die schädigende Wirkung von H_2O_2 konnte durch die Zugabe von 4 mM NAC aufgehoben werden, welches für alle weiteren Versuche als Positivkontrolle verwendet wurde (Abbildung 20; B).

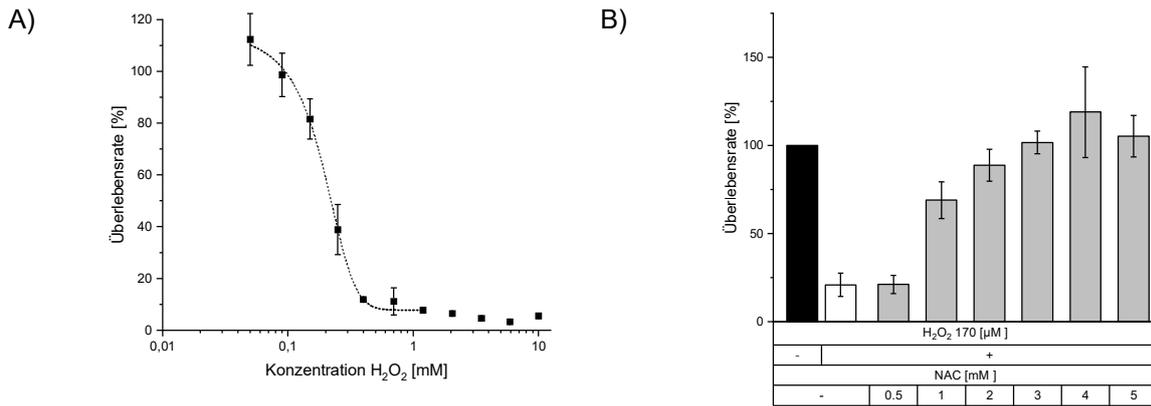


Abbildung 20. (A) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen H₂O₂ auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (B) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen H₂O₂ induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Aufgrund der schlechten Reproduzierbarkeit des schädigenden Effekts von H₂O₂ wurde alternativ für die Untersuchung des durch Peroxid-induzierten oxidativen Stress Cumolhydroperoxid (CHP) verwendet. Auch CHP gehört zur Gruppe der organischen Hydroperoxide und kann ähnlich wie H₂O₂ oxidativen Stress auslösen, indem es ROS freisetzt.

Der ermittelte IC₅₀ von CHP lag bei einer Konzentration von 21,09 ± 0,157 μM (Abbildung 21; A; B). Da 2 mM NAC einen protektiven Effekt gegen die CHP induzierte Zellschädigung zeigte, wurde NAC als Positivkontrolle verwendet (Abbildung 21; C).

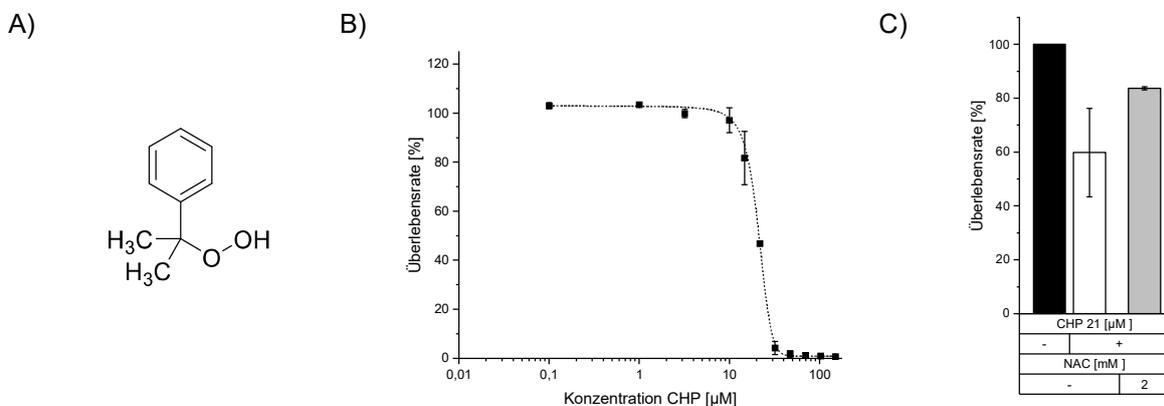


Abbildung 21. (A) Chemische Struktur von Cumolhydroperoxid (CHP). (B) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen CHP auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (C) Neuroprotektiver Effekt von NAC gegen CHP induzierte Hypoxie. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Die Untersuchung des anti-oxidativen Effekts der Referenzsubstanzen unter Verwendung des CHP-induzierten oxidativen Stress Assays ergab für keines der getesteten Chalkone einen neuroprotektiven Effekt (Abbildung 22 A; B; C). Auch die Behandlung mit Flavanonen hatte nur eine minimale Auswirkung auf die schädigende Wirkung des Peroxids. Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A zeigten beide bei einer Zugabe von 0,5 μM eine höhere Überlebensrate als die nur mit CHP behandelten Zellen. Dies könnte eine antioxidative Wirkung gegen ROS andeuten, bedarf aber weiterer Experimente, da sich die Ergebnisse nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden (Abbildung 22 D; E; F).

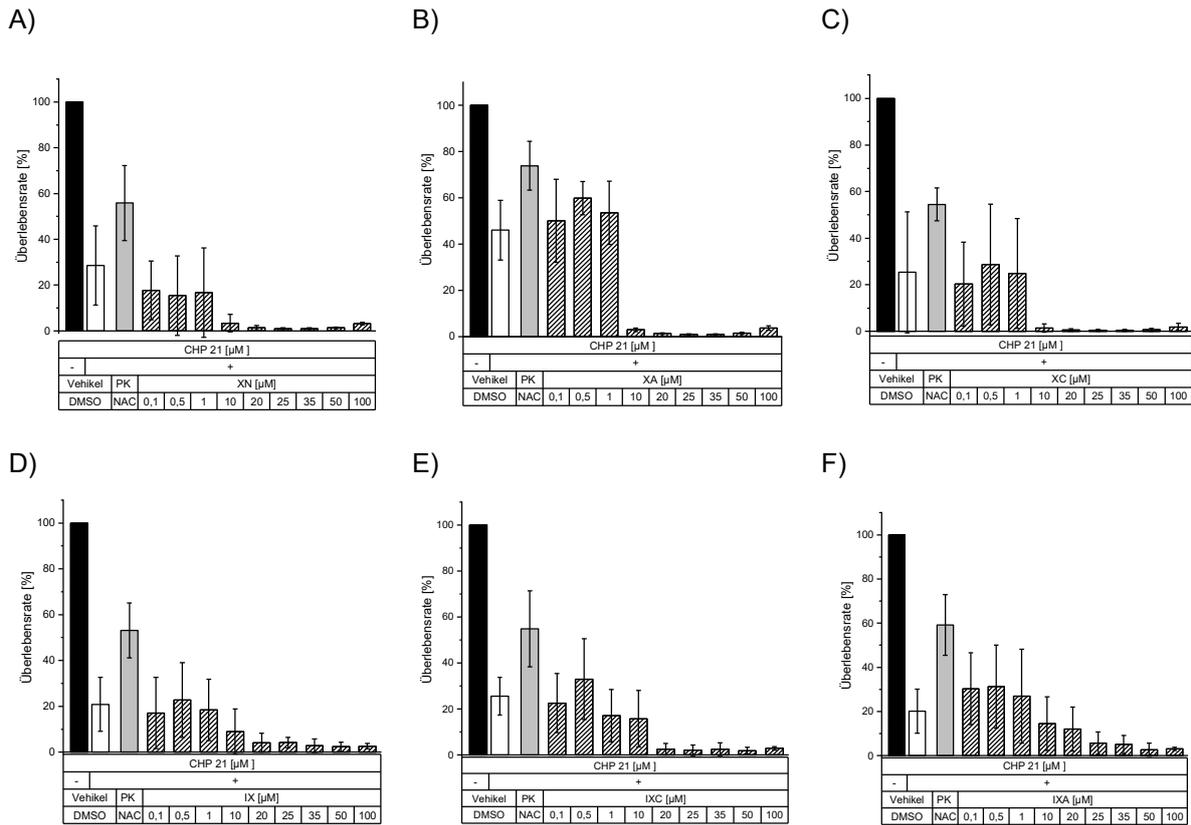


Abbildung 22. Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B), und Xanthohumol A (C), sowie von Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen CHP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 2 mM NAC als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 21 μM CHP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Zur besseren Evaluierung eines möglichen protektiven Effekts, wurde eine Normierung durchgeführt. Dazu wurden die gemessenen Überlebensraten (SR) durch die gemessenen Überlebensraten der SNP-Kontrolle (T) dividiert. Werte größer 1 deuten somit auf einen möglichen protektiven Effekt hin (Abbildung 23).

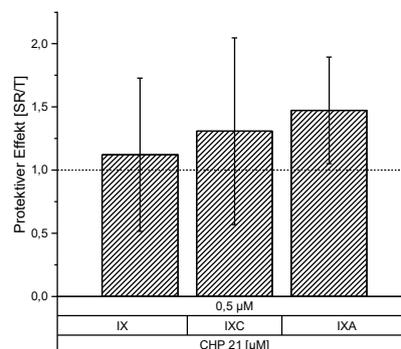


Abbildung 23. Neuroprotektiver Effekt von Isoxanthohumol, Isoxanthohumol C und Isoxanthohumol A gegen CHP induzierten oxidativen Stress. Werte wurden mit der Treatment-Kontrolle T (nur CHP behandelte Zellen) normiert; (n=3).

Die Untersuchung der prenylierten Flavonoide gegen Cumolhydroperoxid induzierten oxidativen Stress ergab keinen neuroprotektiven Effekt. Keine der getesteten Konzentrationen konnte das Absterben der Zellen verhindern. Allerdings konnte beobachtet werden, dass ab einer Konzentration von größer 1 μM die Überlebensrate der Zellen deutlich reduziert wurde (Abbildung 24).

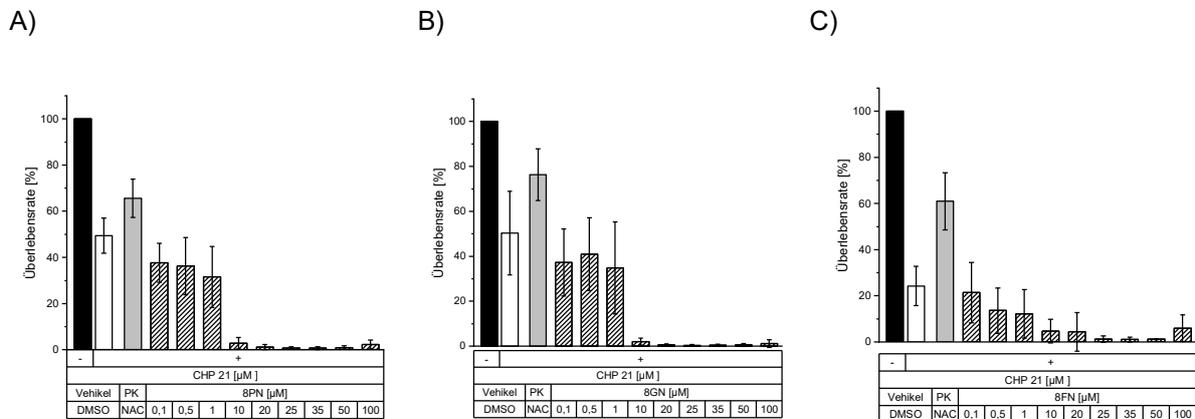


Abbildung 24. Neuroprotektiver Effekt der prenylierten Flavonoide 8-Prenylarigenin (A), 8-Geranylaringenin (B) und 8-Farnesylaringenin (C) gegen CHP induzierten oxidativen Stress; (n=3).

4.2.2.3 Oxidativer Stress – NO-Referenzsubstanzen

Neben ROS ausgelöstem oxidativen Stress gibt es auch noch reaktive Stickstoff-Spezies (NOS), die in der Lage sind, nitrosativen Stress auszulösen. Dies bildet die Arginin/NO Synthase getriebene entzündliche Komponente des Zelltods ab. Ein in der Forschung weit verbreiteter NOS Donor ist Natrium Nitroprusside (SNP) (Abbildung 25; A). Gelöst in Wasser, setzt es NO frei. Das dadurch entstehende NO löst nitrosativen Stress bei den behandelten Zellen aus (Lee et al. 2012).

Auch für diesen Assay wurde zu Beginn eine geeignete Konzentration für die Behandlung mit SNP ermittelt, welche bei 1,91 mM (IC_{50}) lag (Abbildung 25; B). Eine Konzentration von 0,1 mM Ascorbinsäure (VC) konnte den schädigenden Effekt von SNP teilweise aufheben, und wurde deshalb für alle weiteren Versuche als Positivkontrolle genutzt (Abbildung 25; C).

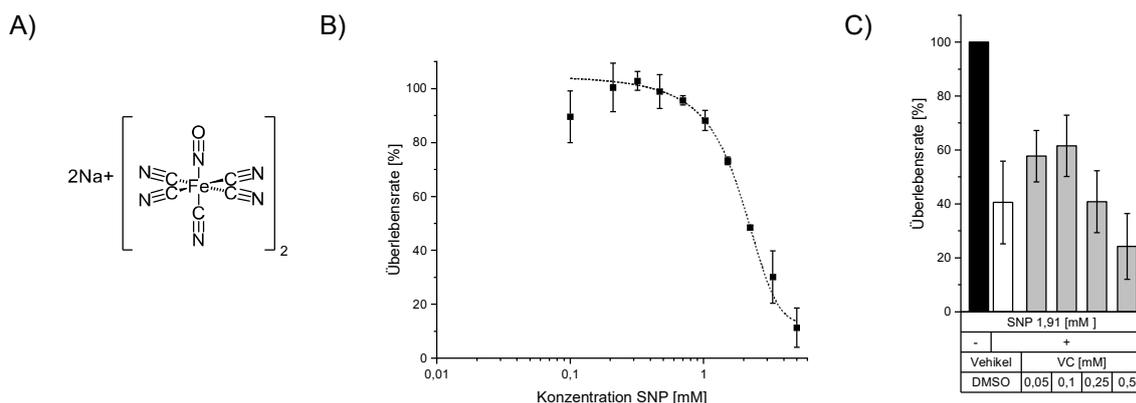


Abbildung 25. (A) Chemische Struktur von Natrium Nitroprusside (SNP). (B) Zytotoxizität von unterschiedlichen Konzentrationen SNP auf die Viabilität von SH-SY5Y Zellen nach 24 h. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (unbehandelte Zellen) (n=3). (C) Neuroprotektiver Effekt von Vitamin C gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Trotz der in der Literatur vielfach beschriebenen anti-oxidativen Wirkung resultierte die Untersuchung des anti-oxidativen Effekts der Referenzsubstanzen im Rahmen des durch SNP induzierten oxidativen Stress Assays in keiner neuroprotektiven Wirkung für eine der getesteten Referenzsubstanzen (Abbildung 26).

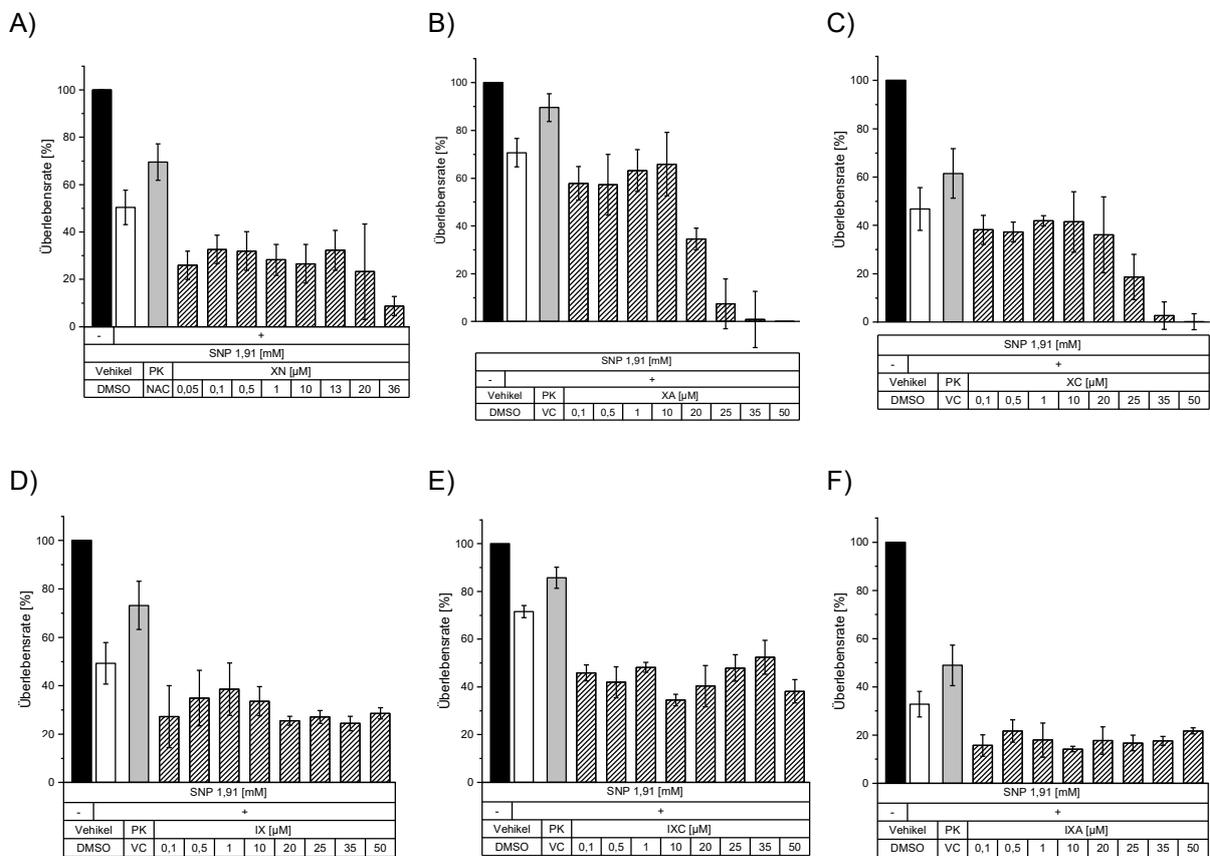


Abbildung 26. Neuroprotektiver Effekt von Xanthohumol (A), Xanthohumol C (B), und Xanthohumol A (C), sowie von Isoxanthohumol (D), Isoxanthohumol C (E) und Isoxanthohumol A (F) gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 0,1 mM Ascorbinsäure (VC) als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 1,91 mM SNP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Anders dagegen konnte bei den prenylierten Flavonoiden festgestellt werden, dass mit steigender Kettenlänge die anti-oxidative Wirkung der Flavanone gesteigert wurde. Während 8- Prenylnaringenin bei keiner der getesteten Konzentrationen eine protektive Wirkung zeigte (Abbildung 27; A), konnte bei einer Zugabe von 10 µM 8-Geranylaringenin oder 5 µM 8-Farnesylaringenin die schädigende Wirkung von SNP auf die SH-SY5Y Zellen abgeschwächt werden (Abbildung 27; B; C).

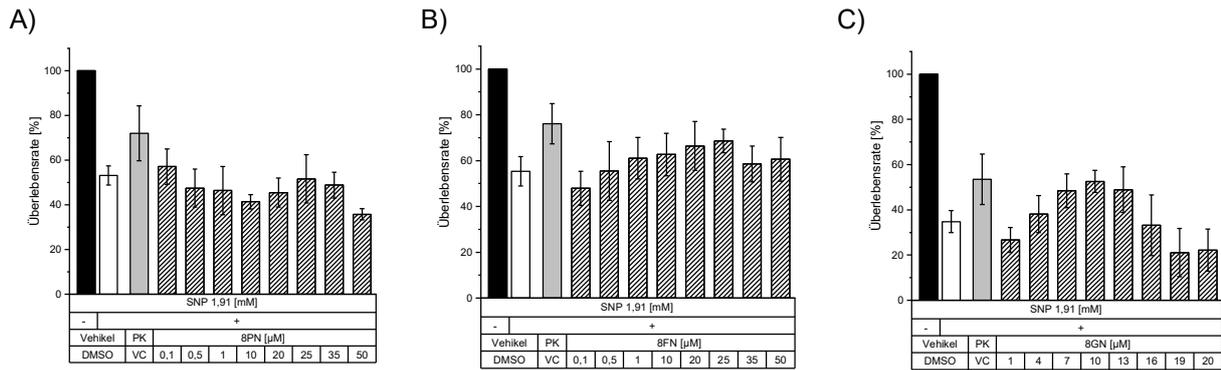


Abbildung 27. Neuroprotektiver Effekt von 8-Prenylnaringenin (A), 8-Geranylnaringenin (B) und 8-Farnesylnaringenin (C) gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanz oder 0,1 mM Ascorbinsäure (VC) als Positivkontrolle (PK) behandelt und 4 h später mit 1,91 mM SNP behandelt. Nach 24 h wurde die Viabilität der Zellen ermittelt. Die Daten zeigen die prozentuale Überlebensrate errechnet aus der Kontrolle (n=3).

Für eine bessere Veranschaulichung des neuroprotektiven Effekts von 8-Geranylnaringenin (8GN) und 8-Farnesylnaringenin (8FN) wurde, wie schon bei CHP-Assay, eine Normierung der Werte vorgenommen. Werte über 1 deuten einen anti-oxidativen Effekt gegen SNP induzierten nitrosativen Stress an (Abbildung 28). Obwohl der protektive Effekt von 8FN niedriger ist als der neuroprotektive Effekt von 8-GN, ist dennoch zu beachten, dass 8FN bereits bei einer Konzentration von 5 µM einen protektiven Effekt zeigt.

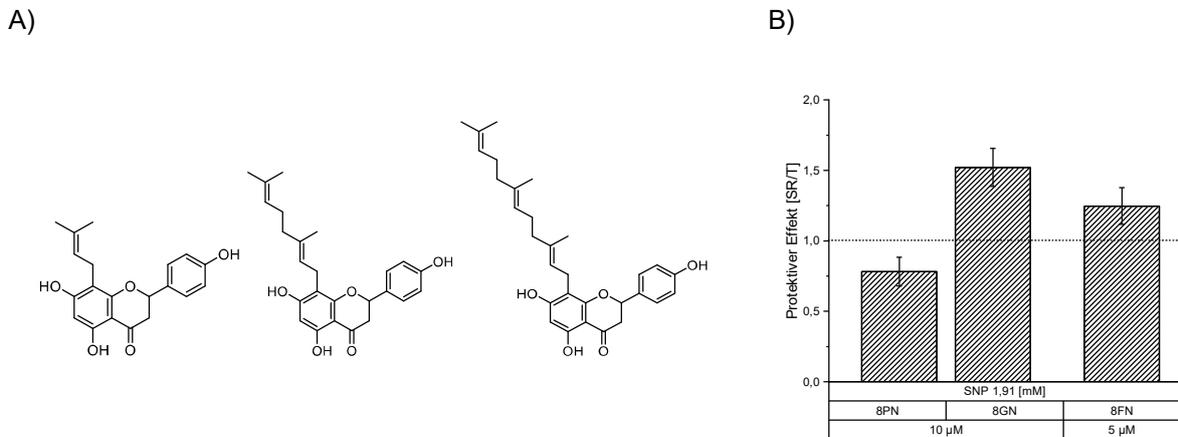


Abbildung 28. (A) Chemische Strukturen der prenylierten Flavanone. (B) Normierter neuroprotektiver Effekte gegen SNP induzierten oxidativen Stress von 8PN, 8GN und 8FN durch Verlängerung der Prenylseitenkette; (n=3).

4.2.2.4 Oxidativer Stress – NO- Test Extrakte

Neben den Referenzsubstanzen und den prenylierten Flavanonen, wurde der SNP Assay auch genutzt, um die unterschiedlichen Hopfenextrakte auf ihre anti-oxidative Wirkung zu testen. Wie bereits erwähnt, wurden der Hopfentreber auf unterschiedliche Weise behandelt, um den Gehalt des neuroregenerativen Xanthohumol A zu steigern, indem Xanthohumol direkt im Treber oder nach Extraktion aus dem Treber säurekatalysiert zu Xanthohumol A umgesetzt wurde. Die Fraktionierung der Extrakte geschah mittels einer Polyamind (PA)-Säule, wobei für jeden Extrakt eine H₂O-, HP-α-CD-, HP-γ-CD; HP-β-CD und abschließend eine MeOH-Fraktion gewonnen wurde. Vorversuche mit unterschiedlichen

Konzentrationen an Extrakten zeigten, dass bei einer Konzentration von 22 µg/mL kein negativer Einfluss auf die Zellviabilität gegeben war. Alle Extrakte/Fractionen wurden anschließend mit einer finalen Konzentration von 22 µg/mL in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst auf ihre anti-oxidative Wirkung im Rahmen des SNP-Assays getestet.

Zunächst wurde der Rohextrakt aus dem Hopfentreber im SNP-Assay getestet. Der Rohextrakt zeigte keinen neuroprotektiven Effekt gegen SNP induzierten oxidativen Stress (Abbildung 29), die Zellviabilität verblieb auf dem Niveau der mit SNP behandelten Zellen.

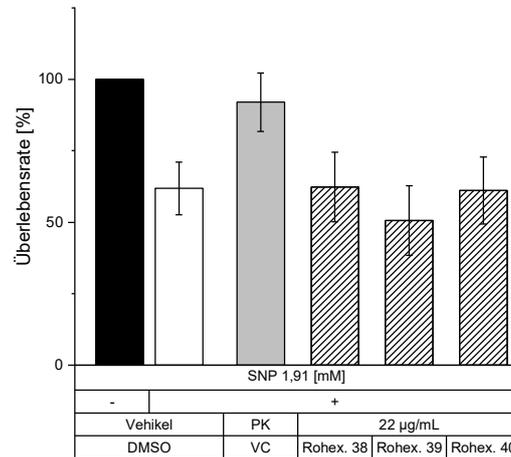
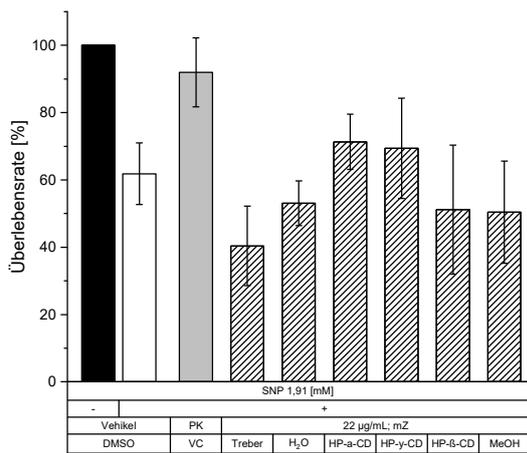


Abbildung 29. Screening des neuroprotektiven Effekts der unterschiedlichen Rohextrakte aus dem Hopfentreber gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).

Der Rohextrakt wurde anschließend mittels flüssig-flüssig Extraktion fraktioniert. Sowohl der Extrakt (oZ) aus der flüssig-flüssig Extraktion wie auch der Rohextrakt (mZ) wurden mittels des Cyclodextrin-unterstützten Filtrationsverfahren fraktioniert und die Fraktionen im SNP-Assay getestet.

Die Vorbehandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte mit Zucker (mZ) (Abbildung 30; A) beziehungsweise ohne Zucker (oZ) (Abbildung 30; B) zeigten für die beide HP-α-Fractionen jeweils einen leicht protektiven Effekt auf die Neuroblastoma Zelllinie. Für alle anderen Fraktionen konnte kein protektiver Effekt gegen SNP induzierten oxidativen Stress festgestellt werden.

A)



B)

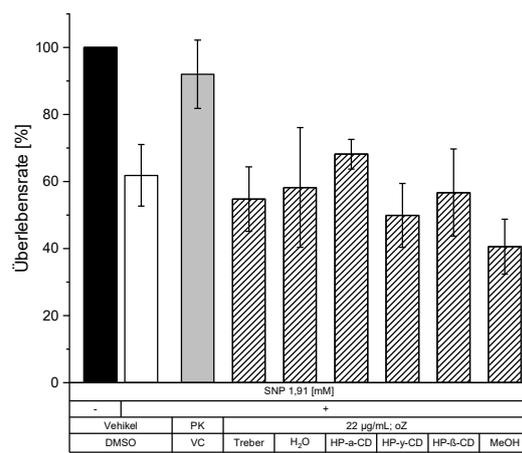
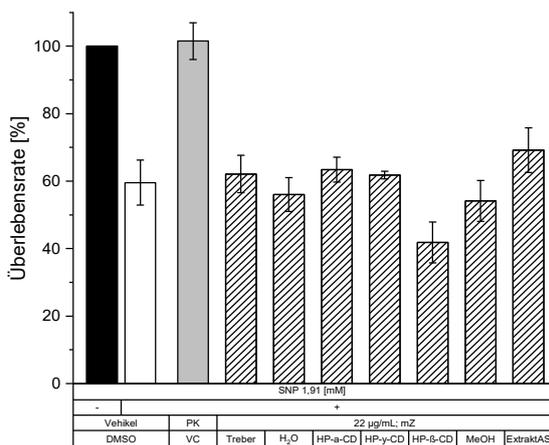


Abbildung 30. Screening des neuroprotektiven Effekts der Hopfenextrakte direkt aus dem Hopfentreber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ=mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).

Einen deutlicheren Unterschied konnte man bei der Behandlung der Zellen mit den unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte mZ (Abbildung 31; C) und oZ (Abbildung 31; D) feststellen, die im Anschluss an die Extraktion aus dem Treber mit Säure umgesetzt worden waren. Während die mit Säure umgesetzten Fraktionen des Trebers mZ keinen protektiven Effekt auf die Zellen zeigten, konnte ein deutlich protektiver Effekt für die beiden Fraktionen Treber und MeOH festgestellt werden. Alle anderen Fraktionen zeigten aber keinen protektiven Effekt. Dies weist darauf hin, dass es bereits bei der säurekatalytischen Umsetzung Unterschiede im Reaktionsverhalten ausgelöst durch unbekannte Inhaltsstoffe gibt.

C)



D)

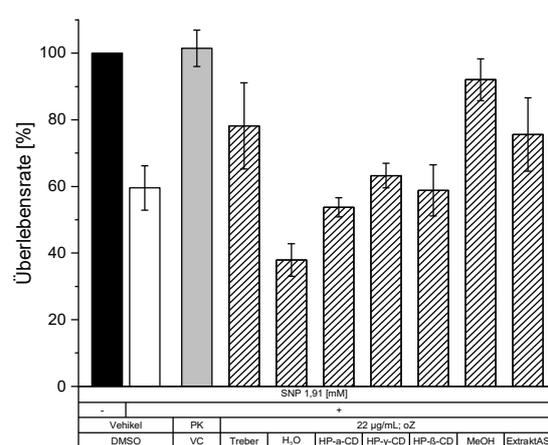


Abbildung 31. Screening des neuroprotektiven Effekts der Hopfenextrakte direkt aus dem Hopfentreber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ=mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).

Neben den Extrakten des Trebers die nach Extraktion mittels Säure behandelt wurden, wurden aber auch die Extrakte untersucht, die aus einem Säure-behandelten Hopfentreber gewonnen wurden. Die Analyse des anti-oxidativen Effekts der verschiedenen Fraktionen ergab keinen protektiven Effekt der Fraktionen direkt aus dem umgesetzten Treber (Abbildung 32, A). Die Fraktionen aus dem Treberextrakt

des Rückstands zeigten allerdings einen protektiven Effekt für die Fraktion HP-γ-CD und HP-β-CD (Abbildung 32, B).

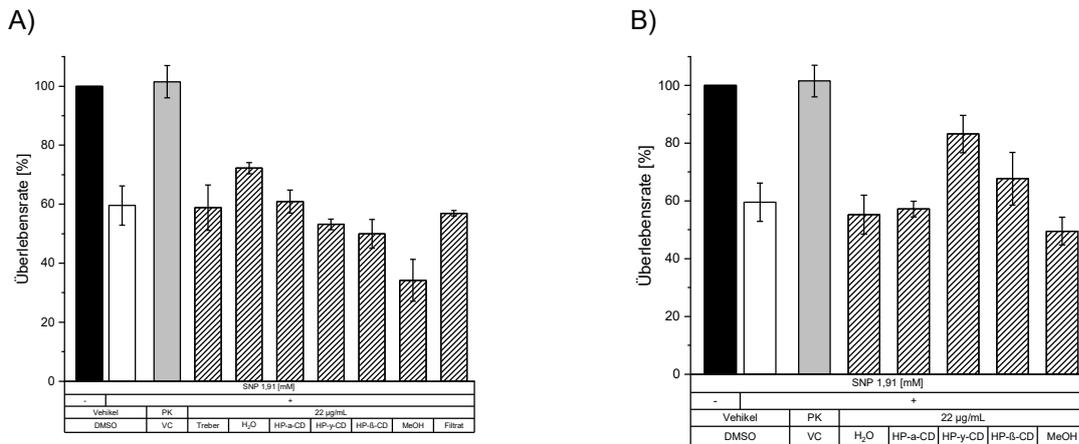


Abbildung 32. Screening des neuroprotektiven Effekts der unterschiedlichen Hopfenextrakte aus dem mit Säure behandelten Hopfentreiber mit oder ohne Zucker. oZ=ohne Zucker; mZ= mit Zucker gegen SNP induzierten oxidativen Stress. Die Überlebensrate der SH-SY5Y Zellen wurde mit dem MTT-Assay ermittelt; (n=3).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die neuroprotektive Wirkung der Hopfenextrakte stark von der Herstellung abhängt und nicht direkt mit der Anwesenheit des Xanthohumol A korreliert. Hier muss berücksichtigt werden, dass es sich bei den gewonnenen Extrakten um Substanzgemische handelt, und die resultierenden protektiven bzw. anti-oxidativen Effekte derer auf das Zusammenspiel verschiedener Inhaltsstoffe beruhen können. Dennoch kann festgehalten werden, dass die säurekatalytische Umwandlung in Kombination mit dem Cyclodextrin-basierten Filtrationsverfahren zu Extrakten mit protektivem Effekt in Bezug auf SNP führt.

4.2.2.5 Neuroregenerative Aktivität der Extrakte

Neben ihrer anti-oxidativen Wirkung wurde das neuroregenerative Potential der Extrakte des Hopfentreibers mittels dualem Reporteragenassay basierend auf Luciferase-Enzymen gemessen. Um Interaktionen mit dem Enzym auszuschließen, wurde zunächst die Wirkung der Extrakte auf die Luciferase in einem enzymatischen Assay bestimmt. Wie die meisten Luciferasen arbeitet auch die Ultra-Glo Luciferase Magnesium und Adenosintriphosphat abhängig. Das Enzym katalysiert die Reaktion von Luciferin in Oxyluciferin unter Freiwerden von Licht. Die dabei entstehende Menge von Oxyluciferin ist proportional zum Gehalt des ATPs im Medium (Abbildung 33). Da ATP ausschließlich von lebenden Organismen produziert wird, eignet sich diese Methode also hervorragend für die Bestimmung von lebenden und toten Zellen (Riss et al. 2004).

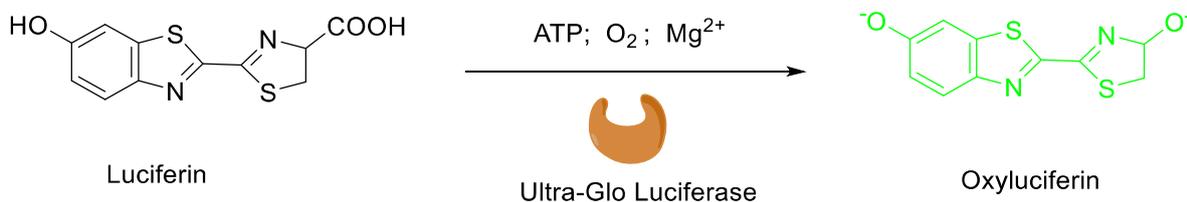


Abbildung 33. Reaktionsschema zur Umwandlung von Luciferin in das lumineszierende Oxyluciferin mittels der enzymatischen Katalyse durch die Ultra-Glo Luciferase.

Ein Großteil der getesteten Extrakte zeigte keine inhibierende oder aktivitätssteigernde Wirkung auf das Enzym. Wie in Abbildung 34; A dargestellt ist konnte bei neun Extrakten ein geringer inhibierender Effekt

auf die Luciferase festgestellt werden und ein leicht gesteigerter Effekt konnte, wie in Abbildung 34, B dargestellt ist, in vier unterschiedlichen Extrakten gezeigt werden

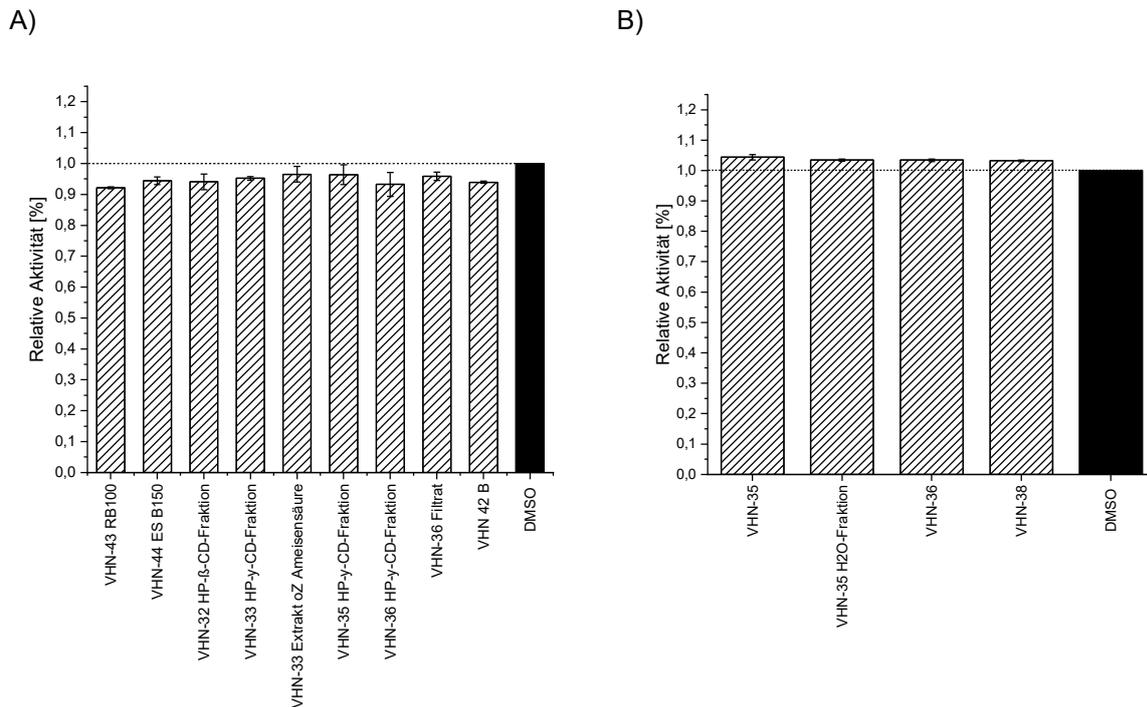


Abbildung 34. Effekt der Extrakte auf die Katalyseaktivität der Ultra-Glo Luciferase. (A) Inhibierender Effekt auf die Luciferaseaktivität. (B) Leistungssteigernder Effekt auf die Luciferaseaktivität; (n=3).

Da die Abweichungen allerdings unter 10 % betragen, konnten die Extrakte anschließend im dualen Luciferase-Reporterprotein-Assay (Dyer et al. 2000) untersucht werden. Dieser Assay findet Verwendung in der Bestimmung eines neurodifferenzierenden Potentials unterschiedlicher Substanzen basierend auf embryonalen Stammzellen der Maus. Dafür werden zwei unterschiedliche Luciferasen verwendet. Als Marker für die Zellzahl der Testsubstanzen wird die *Renilla reniformis* Luciferase verwendet, mittels derer auf die Überlebensrate der Zellen rückgeschlossen werden kann. Zum anderen zeigt die Verwendung der *Photinus pyralis* Luciferase, deren Aktivität an die Expressierung des Neuronenmarkers Doublecortin gekoppelt ist, inwiefern die Testsubstanz die Differenzierung der Zelle in Richtung eines Neurons initiiert. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Wiederholungen zu schaffen, wurde dafür eine Normierung der Werte vorgenommen. Dazu wurde zuerst für beide Luciferasen die gemessene Fluoreszenz der einzelnen Wells durch die Kontrolle dividiert und anschließend wurden die beiden so normierten Werte gegeneinander normiert, um die Differenzierungs-auslösende Aktivität DIA zu erhalten (Gleichung 2).

$$(2) \quad DIA = \frac{Photinus (normiert)}{Renilla (normiert)}$$

Je höher dieser Werte ist, desto stärker ist die Differenzierungs-auslösende Aktivität der Testsubstanz. Allerdings muss man bei der Beurteilung des DIA-Werts beachten, dass zytotoxisch wirkende Substanzen eine stark erniedrigte normierte Renilla-Aktivität verursachen, die diesen Quotienten wiederum falsch positiv beeinflussen. Deshalb ist es wichtig zur Evaluierung des DIA-Werts parallel auch die normierte Renilla-Aktivität (NRA) zu betrachten. Nicht zytotoxische Substanzen haben in der Regel Renilla-Werte nahe eins oder größer. Parallel zu den Extrakten wurde eine bekannte differenzierungsauslösende Substanz, in diesem Fall ein Gemisch aus 50 µM Valproinsäure und

10 μM Retinsäure, getestet, um eine etwaige Differenzierungs-auslösende Aktivität besser einordnen zu können.

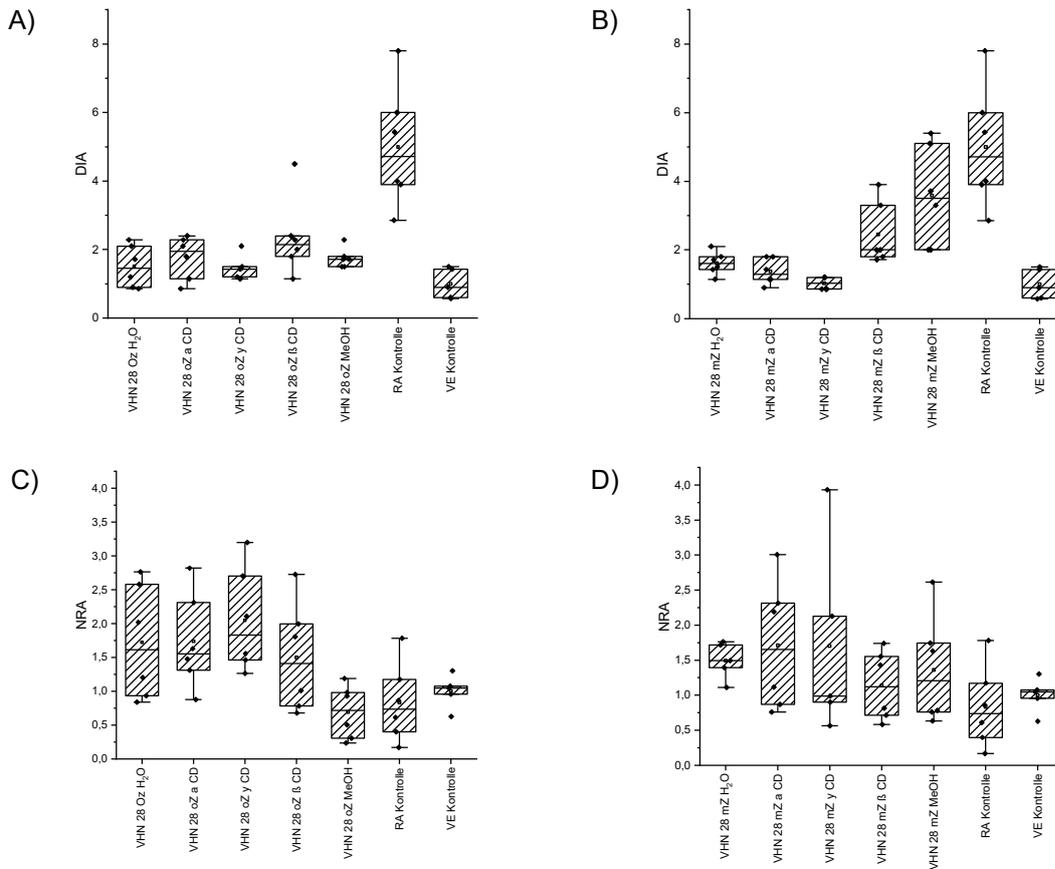


Abbildung 35. Screening der unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte ohne Zucker (A; C) und mit Zucker (B; D) auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) ($c = 22 \mu\text{g/mL}$); ($n = 2$).

Die normierten Renilla-Aktivitäten (NRA) zeigten für alle Fraktionen der Treberextrakte mit und ohne Zucker kaum eine zytotoxische Wirkung bei einer Konzentration von $22 \mu\text{g/mL}$ (Abbildung 35; C, D). NRA-Werte, die stark über eins lagen, könnten sogar eine proliferationssteigernde Wirkung andeuten, allerdings müsste dies im Rahmen weiterer Versuche genauer untersucht werden. Einzig die Methanol-Fraktion des Treberextrakts mit Zucker (Abbildung 35; C, D) hatte eine leicht höhere zytotoxische Wirkung auf die Zellen. DIA Werte > 1 zeigen hier eine differenzierungsinduzierende Aktivität an. Die Evaluierung des differenzierungsauslösenden Effekts ergab für die HP- β -Cyclodextrin Fraktionen eine geringe differenzierungsinduzierende Wirkung an, welche allerdings weit geringer als die Aktivität der Positivkontrolle, Valproinsäure-Retinsäure Gemisch, war. (Abbildung 35).

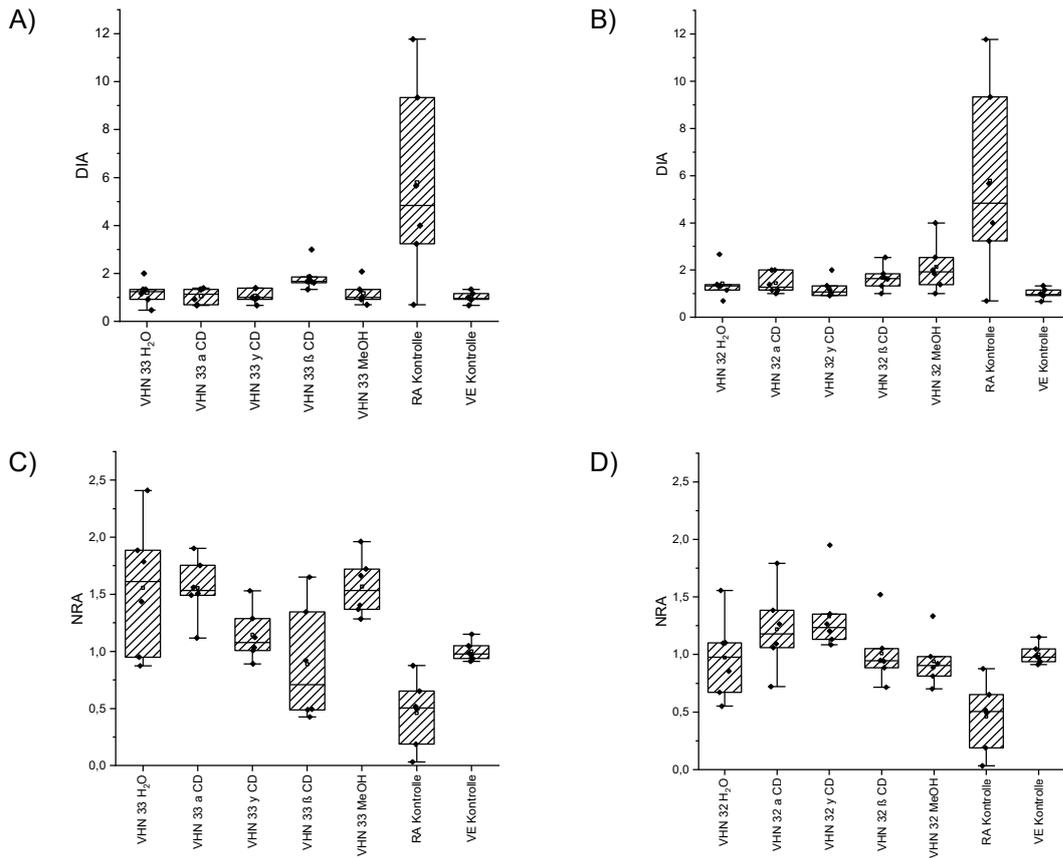


Abbildung 36. Screening der unterschiedlichen Fraktionen der Treberextrakte ohne Zucker (A; C) und mit Zucker (B; D), die jeweils mit Ameisensäure umgesetzt worden sind, auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) ($c = 22 \mu\text{g}/\text{mL}$); ($n = 2$).

Auch die Evaluierung der NRA-Werte der mit Säure umgesetzten Treberextrakte mit und ohne Zucker ergab keine zytotoxische Wirkung auf die embryonischen Maus Vorderhirnzellen. Auch hier wurde ein Trend zu DIA-Werten > 1 bei den HP- β -Cyclodextrin Fraktionen festgestellt, welcher ebenfalls nicht im Bereich der Positivkontrolle lag. (Abbildung 36). Gleiches zeigte sich bei den Extrakten aus dem mit Säure behandelten Treber (Abbildung 37)

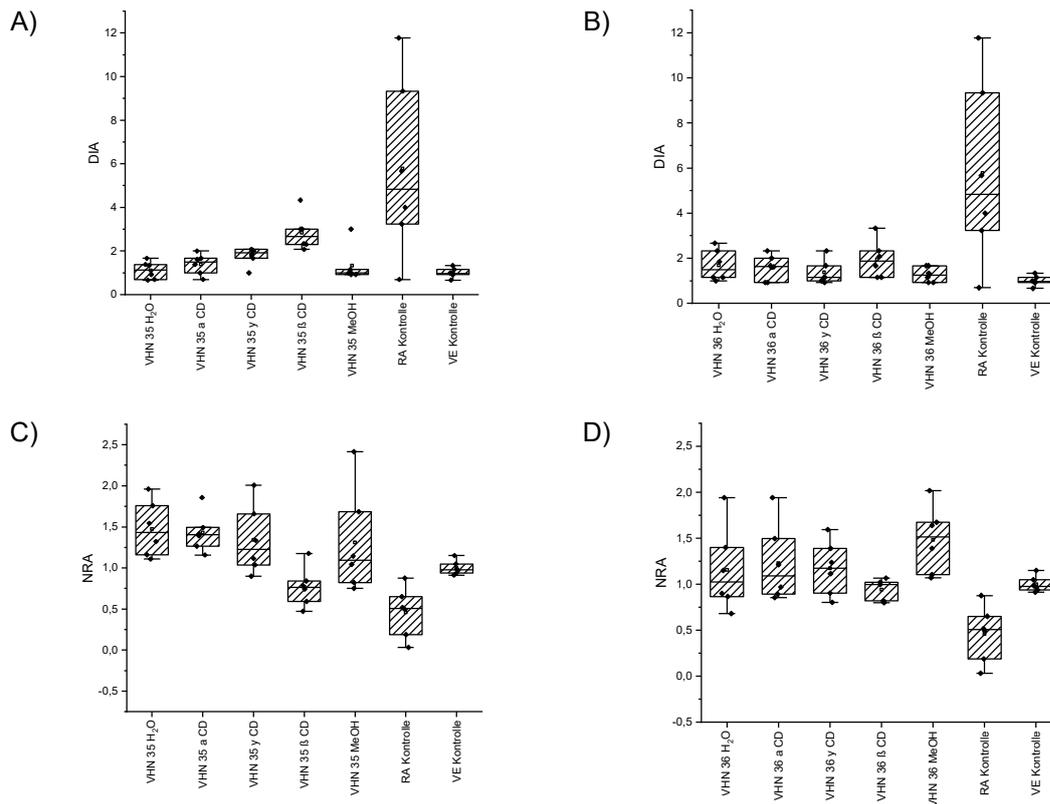


Abbildung 37. Screening der unterschiedlichen Fraktionen des mit Ameisensäure umgesetzten Trebers (A; C) und des Treberextrakts aus dem Rückstand (B; D), auf ihre neurodifferenzierungsauslösende Aktivität (DIA) und ihre zytotoxische Wirkung auf embryonische Vorderhirnzellen der Maus, mittels der normierten Renilla-Aktivität (NRA) ($c = 22 \mu\text{g/mL}$); ($n = 2$).

Die mit HP- β -Cyclodextrin erhaltenen Fraktionen zeigten durchwegs einen Trend zu höheren DIA Werten. Abbildung 15 zeigt die Gehalte der Extrakte an den Referenzsubstanzen in den HP- β -Cyclodextrin Fraktionen in Prozent. Vergleicht man die DIA Werte mit den Gehalten an Referenzsubstanzen, zeigt sich im Fall der mit Säure umgesetzten Proben ein Trend zur Korrelation der DIA mit einem erhöhten Gehalt an Xanthohumol A.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die mit HP- β -Cyclodextrin gewonnenen Fraktionen eine neuroregenerative Aktivität aufweisen. Dieser Effekt ist wesentlich geringer als jener der Positivkontrolle, was nicht verwunderlich ist, da es sich bei Extrakten um Substanzgemische handelt. Vorteilhaft ist, dass die Extrakte keinen so starken Effekt auf die Zellzahl aufweisen, wie die Positivkontrolle.

4.3 Arbeitspaket 4: Produktattribute und Zielgruppen

4.3.1 Verbraucheransprüche und Produktkonzepte Vorgehen

Im ersten Projektjahr wurden zunächst eine umfangreiche Literaturrecherche zu bisherigen Erkenntnissen über Verbraucheransprüche an pflanzlichen Gesundheitsprodukten sowie zu möglichen Erhebungsinstrumenten von Verbraucheraspekten durchgeführt. Dazu wurden wissenschaftliche Publikationen, Statistiken, Projektberichte sowie weitere relevante Dokumente und Datenbanken herangezogen. Diese behandelten vor allem Themen rund um den Markt von natürlichen Gesundheitsprodukten (kurz NHP aus dem englischen natural health product) und spezifischer dem

Markt natürlicher Gesundheitsprodukte zur Unterstützung von Gedächtnis- und Konzentrationsleistung (kurz NHPCC aus dem englischen natural health product for cognition and concentration), Eigenschaften und Beschreibungen der Verbraucher von NHP, deren Konsumverhalten und Einflussfaktoren auf das Konsumverhalten, Gesundheitsverhalten, Modelle zu Werten und Gesundheitsverhalten sowie zu qualitativen, quantitativen und statistischen Methoden der Marktforschung und Datenanalyse.

Auf Basis der gewonnenen Erkenntnisse aus der Literaturanalyse wurden die folgenden Arbeitsschritte für das Erreichen der im Projektantrag definierten Ziele geplant und durchgeführt. Für den ersten Teil des AP 4 wurden zunächst Interviewleitfäden für semi-strukturierte Interviews erstellt, die im Zeitraum zwischen dem 15. Oktober und 11. Dezember 2020 unter Beachtung der zu dem Durchführungszeitpunkt geltenden Corona-Reglungen und unter Einhaltung eines Hygienekonzeptes in Präsenz am TUM Campus Straubing durchgeführt wurden. Die Ergebnisse der Tiefeninterviews bilden die Basis für die angeschlossene repräsentative Online-Umfrage (siehe unten).

Alle erforderlichen Dokumente, inklusive des Interview-Leitfadens, wurden zuvor von dem Datenschutzbeauftragten der HSWT sowie der Ethik-Kommission der Technischen Universität München (Beschluss vom 08.10.2020) geprüft und genehmigt. Die Teilnehmerrekrutierung erfolgte über klassische Printmedien sowie über Online-Medien.

Die Interviews wurden nach dem Means-End-Chain (MEC) Ansatz mit der Laddering-Methode als einem zentralen Interviewbaustein durchgeführt. Alle Teilnehmer wurden vorab über das Ziel der Studie aufgeklärt und gaben eine informierte Einwilligung.

Die MEC ist eine geeignete Methode, um Assoziationsketten zwischen konkreten Schlüsselattributen am Produkt, die vom Verbraucher mit bestimmten Konsequenzen in Verbindung gebracht werden, und abstrakten, objektunabhängigen, aber bei Entscheidungen mitwirkenden Werten, aufzudecken. Über die Fragetechnik, die sich durch eine Kette von „Warum-Fragen“ auszeichnet, werden diese Assoziationsketten (Ladder) offengelegt (Reynolds und Olson 2001). Die Identifizierung der Schlüsselattribute der Produkte mit pflanzlichen Wirkstoffen erfolgte mit dem Einsatz einer Design Thinking Methode in Form von Scribbles. Sie eignet sich, um Designideen zu entwickeln und zu visualisieren (Greenberg et al. 2012). Konkret wurden hierbei die Grundideen des Probanden für die Produktinnovation eines Produkts mit pflanzlichen Inhaltsstoffen zur Unterstützung der Gedächtnisleistung visualisiert. Nach dem Gedankenexperiment unter Einsatz der Scribble-Methode wurden die von den Teilnehmenden genannten, für sie konsumrelevanten Produkteigenschaften kategorisiert auf Karten geschrieben. Diese haben die Teilnehmenden im Anschluss einmal auf ihre Relevanz im Entscheidungsprozess für NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten sowie für NHP mit für den Einsatz bekannten Pflanzenextrakten in eine Rangfolge gebracht.

Unterstützt von zwei wissenschaftlichen Hilfskräften wurden die Interviews nach den Regeln von Dresing und Pehl (2015) wörtlich transkribiert. Nach diesem ersten Schritt der Datenaufbereitung folgte die Erstellung eines Codesystems, welches anschließend auf alle Interviewtranskripte angewendet wurde. Das Kodieren der Interviews wurde mit dem Programm MAXQDA 2020 vorgenommen (VERBI Software 2020). Die Datenauswertung erfolgte anhand des Leitfadens nach Reynolds und Gutman (1988). Die Auswertung wurde durch ein selbst-programmiertes Excel-Tool unterstützt.

Die Scribbles wurden im Rahmen eines Forschungspraktikums (Werner 2021) ausgewertet und als Basis für die Erstellung erster Produktkonzepte verwendet. Die Produktkonzepte wurden mit vier Experten mit pharmazeutischem Hintergrund (z. B. Apotheker, Pharmazeutisch-Technische Angestellte) im Sommer 2021 im Raum Freising mittels qualitativen Interviews diskutiert. Die Experten schätzten die Produktkonzepte zudem bezüglich ihrer Eigenschaften auf das Vermarktungspotential bzw. ihre Eignung für potentielle Zielgruppen ein.

Die Ergebnisse der qualitativen Studien dienten als Grundlage für den nächsten Arbeitsschritt, die Durchführung einer repräsentativen Online-Erhebung zur genaueren Definition des Umfangs der Verbraucheransprüche sowie möglicher Zielgruppen. Ziel war dabei einerseits herauszufinden, welche Relevanz einzelne Produktattribute für eine mögliche Kaufentscheidung haben, andererseits mögliche Zielgruppen weiter einzugrenzen und deren spezifische Produktpreferenzen zu eruieren. Die Rekrutierung der Teilnehmenden erfolgte in Zusammenarbeit mit dem externen Marktforschungsinstitut respondi. In der Studie wurde auf Wohnortgröße, Alter, Geschlecht und Bundesland quotiert, um die Verteilung dieser Merkmale für die deutsche Bevölkerung 18+ abzubilden. Die Umsetzung der Online-Erhebung begann mit der Fragebogenerstellung im 4. Quartal 2021 und lief bis April 2022. Von 2207 Teilnehmenden flossen nach einer Datenbereinigung die Antworten von 1707 Personen in die Analyse und Auswertung der Studie mit ein. Alle Teilnehmer wurden über die Ziele der Studie aufgeklärt und gaben im Vorfeld eine informierte Einwilligung ab.

Bei der Beantwortung des Fragebogens wurde zwischen Nutzern von NHP, potentiellen Nutzern, die bisher keine Erfahrung mit NHP haben, aber einer zukünftigen Verwendung offen gegenüberstehen, und Ablehnern von NHP unterschieden. Nutzer von NHP haben den kompletten Fragebogen beantwortet, beginnend mit Fragen zum allgemeinen NHP-Nutzungsverhalten. Potentielle Nutzer sind mit dem darauffolgenden Teil zur Einstellung gegenüber NHP in den Hauptteil der Umfrage eingestiegen. Beide Nutzergruppen haben im nächsten Schritt an einem in die Umfrage integrierten Choice-Based-Conjoint-Experiment (CBC) teilgenommen (näheres siehe Arbeitspaket 5). Im Anschluss daran wurden noch einige Fragen spezifisch zu der Einstellung gegenüber einem neuartigen Hopfenprodukt für die Neuroregeneration sowie weiteren Konsumentenwünschen gestellt. Die nachfolgenden Umfrageteile wurden von allen Umfrageteilnehmern beantwortet, auch den Ablehnern von NHP. Die Fragen handelten u. a. die Themenblöcke allgemeines Gesundheitsverhalten und weitere soziodemographische Informationen ab. Die Programmierung des Fragebogens sowie die Auswertung des Choice-Based-Conjoint-Experiments erfolgte mit der Sawtooth Software „Lighthouse Studio“. Für die Auswertung der weiteren Daten wurde die Statistik-Software SPSS V26 verwendet.

4.3.2 Ergebnisse und Diskussion

An den persönlichen Tiefeninterviews nahmen insgesamt 26 Menschen, darunter 23 Frauen und drei Männer, aus dem Raum Straubing und Umgebung teil. Alle Teilnehmenden waren über 18 Jahre alt, die meisten (15; 57,7 %) davon zwischen 40 und 59 Jahre. Jeder verwendete innerhalb der letzten 12 Monate pflanzliche Gesundheitsprodukte. Die Hälfte (13) besitzt einen akademischen Berufsabschluss, 14 (53,9 %) leben mit mindestens einer anderen Person zusammen in einem Haushalt. Beim Haushaltsnettoeinkommen verteilen sich die Teilnehmenden relativ ausgeglichen auf die verschiedenen Gehaltsklassen. 21 (80,8 %) Teilnehmende gaben an, gesetzlich versichert zu sein.

4.3.2.1 Verbraucheransprüche Produktattribute

Um zu untersuchen, welche Produktattribute warum für die Konsumenten von NHP relevant sind, wurde der Laddering-Teil der Interviews ausgewertet. Ziel der Auswertung war eine Hierarchical Value Map (HVM) zu erstellen. Dies deckt die wichtigsten Assoziationsketten von konkreten Produktattributen über mit diesen in Verbindung gebrachten Konsequenzen bis hin zu den Werten, die entscheidungswesend wirken, auf. Mindestens drei Teilnehmer mussten dieselben Elemente miteinander in Verbindung gebracht haben, damit eine Verbindung mit den entsprechenden Elementen in der HVM auftaucht. Acht der in Tabelle 8 stehenden Produktattribute haben diese Bedingung erfüllt und wurden miteinander bzw. in Verbindung mit denselben Konsequenzen gebracht. Von insgesamt 26 Konsequenzen wurden 13 von drei oder mehr Personen miteinander bzw. mit denselben Produktattributen oder Werten assoziiert. Auf der mehr abstrakten Ebene, welche zur Erklärung beitragen kann warum ein Produktattribut letztlich relevant für den Konsumenten ist, wurden je 7 instrumentale (z. B. Gesundheit) und terminale (z. B.

Selbstbestimmung) Werte gefunden, von denen je 5 in der HVM abgebildet werden. Die HVM sowie die ausführlichen Ergebnisse sind beim International Journal of Healthcare and Pharmaceutical Marketing unter dem Titel *“From Consumer Values to Attributes of Natural Health Products for Concentration and Cognition: Insights from a Means-End-Chain Study”* zur Veröffentlichung eingereicht.

Die Teilnehmenden wogen bei den Interviews im Durchschnitt 13 (Spannweite zwischen 11 und 16) Produktattributkategorien gegeneinander ab.

Für die Auswertung wurden die jeweils fünf wichtigsten Produktattribute aus jedem Interview entsprechend ihres Ranges gewichtet (Rang 1 mit höchster Gewichtung 5; Rang 5 mit niedrigster Gewichtung 1). Insgesamt 15 Produktattributkategorien schafften es über alle Interviews verteilt mindestens einmal unter die Top 5.

Die Auswertung des Attributrankings zeigt, dass Wirkung, Inhaltsstoffe und Verträglichkeit die wichtigsten Produkteigenschaften sowohl bei NHP mit bekannten als auch mit unbekanntem Pflanzenextrakten sind. Diese drei Produktattribute waren bei über der Hälfte der Teilnehmenden unter den wichtigsten fünf Eigenschaften. Eine ansprechende, informative Deklaration ist bei NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten etwas wichtiger als eine durch Studien belegte Produktqualität. Bei NHP mit bekannten Pflanzenextrakten ist es andersherum. Der größte Unterschied zeigt sich bei sensorischen Produkteigenschaften. Diese haben bei NHP mit bekannten Pflanzenextrakten einen deutlich höheren Stellenwert (Rang 6) als bei NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten (Rang 10). Regionalität und weitere Nachhaltigkeitsaspekte sowohl in Bezug auf die Verpackung, den Herstellungsprozess und (den biologischen Ursprung der) Rohstoffe, befinden sich im Mittelfeld. Das Verpackungsdesign, ob das Produkt tierische Inhaltsstoffe enthält oder vegetarisch bzw. vegan ist, und der Erwerbort wurden im Vergleich zu den zuvor genannten Produkteigenschaften als eher unwichtig bewertet. Auch der Preis liegt bei beiden NHP-Varianten im unteren Drittel der Ranking-Liste. Tabelle 8 zeigt Definitionen und Positionen in der Rangbewertung der Produktkategorien, die es mindestens einmal unter die wichtigsten fünf Produktattribute geschafft haben.

Tabelle 8. Ergebnisse aus dem Attributranking, Relevanz der Attribute für den Konsum von NHP mit bekannten und mit unbekanntem Pflanzenextrakten im Vergleich (n=26).

Produktattribut	Definition	Rang	Rang	Rang gesamt
		bekannte NHP	unbekannte NHP	
Wirkung	Eintreffen eines erwarteten (positiven) Effekts auf Körper oder Psyche	1	1	1
Inhaltsstoffe	Zusammensetzung und Natürlichkeit der Wirk- und ggf. Zusatzstoffe	2	2	2
Verträglichkeit	wenige/keine Neben- und Wechselwirkungen	3	3	3
Deklaration	Informationsgehalt und -aufmachung auf dem Produkt	5	4	4
Qualität	durch Studien belegte Einhaltung von Produktversprechen	4	5	5

Produktattribut	Definition	Rang	Rang	Rang gesamt
		bekannte NHP	unbekannte NHP	
Darreichungsform	physisches Erscheinungsbild des NHP nach dem sich die Einnahme gestaltet	6	6	6
Regionalität	Herkunft und Produktion im näheren Umkreis des Verbrauchers	7	8	7
Biologisch	nachhaltige, pestizidfreie Anbauform der Inhaltsstoffe	9	7	8
Alltagstauglichkeit	Anwendungsfreundlichkeit	8	9	9
Sensorik	Geschmack und Geruch	6	10	9
Nachhaltigkeit	allgemeine Ressourcenschonung und ein mit der Natur vereinbarer Produktlebenszyklus	10	12	10
Preis-Leistung	Verhältnis von monetären Kosten zu individuellem Nutzen	11	13	11
Verpackungsdesign	Attraktivität von Verpackung und Verpackungsmaterial	12	11	12
Vegetarisch/vegan	keine tierischen Inhaltsstoffe	13	12	13
Erwerbort	Anbieter, bei dem das Produkt verfügbar ist und gekauft werden kann	13	14	14

4.3.2.1.1 Offenheit von NHP-Nutzern gegenüber neuen NHP

In den Tiefeninterviews wurde abgefragt, wie offen die Teilnehmer der Interviews gegenüber dem Ausprobieren von für sie neuen NHP sind. Über Zweidrittel der Teilnehmenden waren, wie in Abbildung 38 dargestellt, offen bis sehr offen dafür. Gründe waren u. a. die Überzeugung von der Wirkung von Pflanzen allgemein und eine (eher) ablehnende Haltung gegenüber der Schulmedizin. Knapp ein Viertel der Teilnehmenden gab dabei an, dass eine belegte Wirksamkeit der Pflanzenextrakte Bedingung für ein in Erwägung ziehen des neuen Produkts sei. 23 % der Teilnehmenden gaben an, eher skeptisch gegenüber NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten zu sein und eine Einnahme nur unter bestimmten Voraussetzungen wie z. B. konkreten Beschwerden oder regionaler Herkunft zu erwägen. 8 % standen NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten skeptisch gegenüber, unter anderem begründet durch Sicherheitsbedenken oder Skepsis gegenüber den Vermarktungsinteressen der Pharmaindustrie.

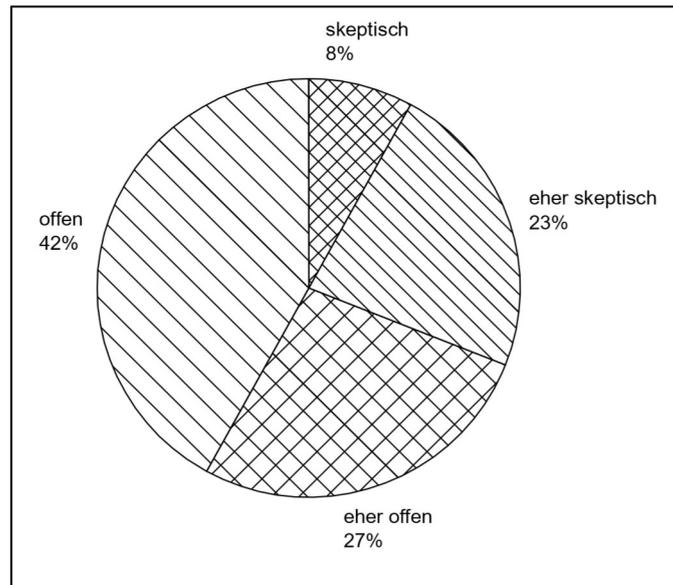


Abbildung 38. Offenheit gegenüber neuen NHP mit unbekanntem Pflanzenextrakten (n=26).

Der relativ hohe Anteil an NHP-Verwendern in der vorliegenden Studie, die offen gegenüber neuen NHP sind, bestärkt die Ergebnisse vorangegangener Studien, welche die Verwender von NHP generell als offen und neugierig auch gegenüber innovativen Ideen und Ansätzen charakterisieren (Sirois und Gick 2002; Sturm 2000). Damit sind Menschen, die bereits NHP verwenden, als Zielgruppe für ein innovatives Hopfenprodukt zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung besonders interessant.

4.3.2.1.2 Erste Produktkonzepte und Zielgruppenbestimmung

Im Rahmen eines studentischen Forschungsprojektes wurden die in dem Gedankenexperiment erstellten Scribbles ausgewertet und erste Produktkonzepte ausgearbeitet. Die Darreichungsform unterschied sich dabei von Tabletten und Tropfen zu Dragees. Abbildung 39 zeigt die Gestaltung der Produktkonzepte.

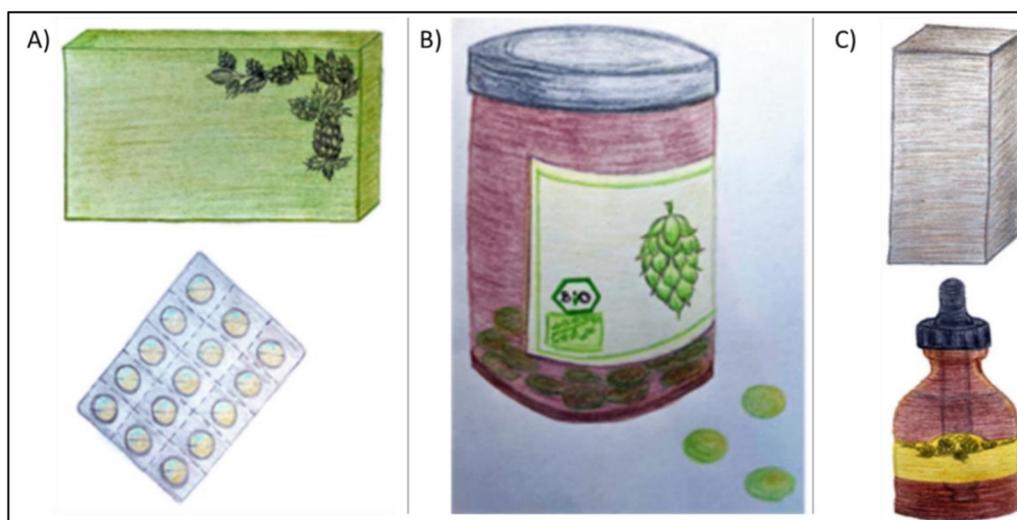


Abbildung 39. Produktkonzepte für A) ein pflanzliches Arzneimittel in Tablettenform; B) ein Nahrungsergänzungsmittel in Drageeform; C) ein pflanzliches Arzneimittel in Tropfenform (Werner, 2021).

Die Tabletten (Abbildung 39 A) und Tropfen (Abbildung 39 C) wurden als pflanzliche Arzneimittel konzipiert, während für die Dragees (Abbildung 39 B) eine Zulassung als Nahrungsergänzungsmittel gewählt wurde. Damit unterscheidet sich dieses Konzept hinsichtlich Werbe- und Gestaltungsmöglichkeiten, da es in der Zulassung unter die Nahrungsergänzungsmittelverordnung und das Lebensmittelrecht statt in das Arzneimittelgesetz fällt (Kooperation Phytopharmaka 2015). Neben je einem Produktkonzept in den genannten Darreichungsformen war zunächst noch ein viertes Produktkonzept in Tee-Form in der Diskussion. Dieses wurde nach den Experteninterviews allerdings verworfen, da eine wirkungsvolle Darreichung als Tee technisch nur sehr schwer bis nicht umsetzbar wäre. Grund dafür ist, dass der Wirkstoff aus Hopfen nur schlecht bis nicht wasserlöslich ist und bei hohen Temperaturen zudem seine Wirkung verlieren würde.

Die nachfolgende Tabelle 9 gibt einen Überblick über die drei abgeleiteten technisch umsetzbaren Produktkonzepte. Beschrieben werden dabei auch die von den Verbrauchern präferierten Ausprägungen der Produkteigenschaften.

Tabelle 9. Produktkonzepte auf Basis der aus den Interviews gewonnenen Erkenntnisse zu den Verbraucheransprüchen an ein neuartiges NHPCC (nach Werner, 2021).

	Tabletten (pflanzliches Arzneimittel)	Dragees (Nahrungsergänzungsmittel)	Tropfen (pflanzliches Arzneimittel)
Allgemeine Anforderungen	<ul style="list-style-type: none"> Wirksamkeit muss gegeben sein Gute Verträglichkeit (keine/ geringe Neben-/ Wechselwirkungen) Hochwertige pflanzliche Inhaltsstoffe Regionalität sowohl der Inhaltsstoffe als auch der Herstellung Reinheit der Produkte (keine/ wenig Zusatz- und Füllstoffe, konzentrierter Wirkstoff) 		
Verpackung	<p>Material/Design</p> <ul style="list-style-type: none"> Material: Pappe Grundfarbe: grün Abbildung der Wirkstoffpflanze und einer Person, welche für Produkt steht Handlich, einfache Aufbewahrung Blister (Sichtverpackung) (ca. 15 Tabletten pro Blister) <p>Deklaration</p> <ul style="list-style-type: none"> Schrift: groß, gut lesbar leicht verständliche Sprache Infos zu Inhaltsstoffen, Wirkung, Neben- & Wechselwirkungen, Dosierung, Wirkstoffkonzentration Herkunftshinweis + Hinweis zu Studien 	<p>Material/Design</p> <ul style="list-style-type: none"> Braunes Glasgefäß mit Deckel (Produkt vor Licht schützen) Ohne Umverpackung Dragees sind lose im Glas Nachhaltig, wiederverwendbar Schlichtes, einfaches, seriöses Design Abbildung der Wirk-Pflanze (Hopfen) Handlich, einfache Aufbewahrung <p>Deklaration</p> <ul style="list-style-type: none"> „Zutaten“, „Verzehrmenge“ Verweise auf mehr Informationen (wissenschaftliche Artikel, Namen) = Transparenz Öko-Label, Bio-Label 	<p>Material/Design</p> <ul style="list-style-type: none"> Umverpackung: Karton in natürlicher Farbe (recyceltes Papier) Braunes Glasfläschchen (Produkt vor Licht schützen) Verschlusskappe mit Pipette (etwas größer, dass leicht zu öffnen) In verschiedenen Größen (20 mL, 50 mL, 100 mL) Stabil und handlich Etikett: gelb/grünlich, natürlich mit Pflanze <p>Deklaration</p> <ul style="list-style-type: none"> alle wichtigen Informationen (Dosierung, Anwendungshinweise) Herkunft, Anbau, Geschichte/Tradition Wissenschaftliche Belege Anwendungshinweise/für welche Diagnose
Produkteigenschaften	<p>Sensorik</p> <p>Farbe: natürlich (beige, grünlich), ohne künstliche Farbstoffe</p> <p>Geschmack: neutral</p> <p>Haptik: angenehme Größe (max. 1 cm)</p> <p>Wirkzeitraum</p> <ul style="list-style-type: none"> nach ca. 4 Wochen <p>Erwartete Wirkung</p> <ul style="list-style-type: none"> sanft & effektiv weniger Ermüdung, leichteres Denken verlängerte Aufmerksamkeitsspanne 	<p>Sensorik</p> <p>Farbe: natürlich (ohne künstliche Farbstoffe)</p> <p>Geschmack: neutral</p> <p>Haptik: glatte Oberfläche (mit Überzug), kleinere angenehme Größe (Vergleichsgröße: Smarties, angenehme Einnahme)</p> <p>Wirkzeitraum</p> <ul style="list-style-type: none"> nach 3-4 Wochen <p>Erwartete Wirkung</p> <ul style="list-style-type: none"> sanft & effektiv höhere Konzentrationsfähigkeit mehr Energie/ sich wacher fühlen Stabilisation der Nerven (geringere Nervosität/ Gereiztheit) 	<p>Sensorik</p> <p>Farbe: natürlich</p> <p>Geschmack: angenehm, neutral</p> <p>Geruch: angenehm, neutral</p> <p>Wirkzeitraum</p> <ul style="list-style-type: none"> nach ca. 3 Wochen, unterstützende Wirkung <p>Erwartete Wirkung</p> <ul style="list-style-type: none"> Konzentrationssteigerung Unterstützung des Erinnerungsvermögens <p>Inhaltsstoffe</p> <ul style="list-style-type: none"> Konservierung mit Alkohol, um möglichst reines Produkt zu erhalten

	Tabletten (pflanzliches Arzneimittel)	Dragees (Nahrungsergänzungsmittel)	Tropfen (pflanzliches Arzneimittel)
		Inhaltsstoffe - Zugabe von B-Vitaminen (B1, B6, B12) zur Unterstützung der Gedächtnisleistung	Haltbarkeit - Geschlossen: ein Jahr - Geöffnet: ca. 3 Monate (kein Kühlschrank)
Anwendung	- Einmal am Tag (morgens) - Einfache Einnahme mit Wasser - Verschiedene Dosiermöglichkeiten (teilbar)	- Einmal am Tag (morgens) - Einfache Einnahme mit Wasser	- Einfache Anwendung - Unverdünnt auf Löffel oder direkt in den Mund - Möglichkeit der verdünnten Einnahme in einem Getränk - Angabe in Tropfen, da hochdosiert - Möglichst nur 1-2mal am Tag bis zu 10 Tropfen/ Einnahme
Preis	- Monatspackung (30 Stk.) ca. 40 € - 3 Monate (90 Stk.) ca. 120 €	- Monatspackung (30 Stk.) ca. 20 € - 3 Monate (90 Stk.) ca. 60 €	- 20 mL ca. 12,50 € - 50 mL ca. 25,00 € - 100 mL ca. 40,00 €
Erwerbort	- Apotheke - Drogerie	- Apotheke (Ansprechpartner) - Drogerie - auch online verfügbar	- Apotheke (Ansprechpartner) - Drogerie
Highlight	- Gutes Preis-/ Leistungsverhältnis - Deklaration	- Bio-Zertifizierung der Inhaltsstoffe - Deklaration	- Anwendung (leichte Anwendung) - Preis-Leistung

Stk. = Stück

Die beschriebenen Produktkonzepte wurden, wie oben beschrieben, in vier Experteninterviews Apothekern und pharmazeutischen Fachangestellten vorgestellt. Ihre Anmerkungen und Vorschläge zur Optimierung der Produktkonzepte sowie zu potentiellen Zielgruppen sind in den folgenden Abschnitten zusammengefasst:

4.3.2.1.2.1 Tabletten

Das Produktkonzept A sieht, nach den Verbraucherwünschen aus den Tiefeninterviews, eine Tablette mit ca. 1 cm Durchmesser vor. Zur Dosierung könnte diese bei Bedarf geteilt werden. Alternativ könnten die Tabletten kleiner konzipiert werden. Eine Dosierung könnte dann über verschieden hohe Wirkstoffkonzentrationen erfolgen. In beiden Fällen kann das Phytopharmazeutikum individuell auf die Bedürfnisse der Verbrauchenden abgestimmt werden. Eine Dosierung über die Wirkstoffmenge hätte allerdings den Vorteil, dass ein möglicherweise unangenehmer Geschmack, der bei einer Teilung von Tabletten entstehen kann, verhindert würde.

Die grüne Farbe der Umverpackung deute laut Experten eher auf ein (pflanzliches) Erkältungsmittel, z. B. zur Behandlung von Atemwegsbeschwerden hin. Die Farben Rot oder Blau seien zur Gestaltung eines NHPCC geeigneter, da sie mehr mit dem Herz-Kreislauf-System und dem Gehirn assoziiert würden.

Von dem Produktkonzept in der Darreichungsform von Tabletten würden laut Experten vor allem berufstätige Menschen zwischen 40 bis 50 Jahren angesprochen. Das Produkt könnte insbesondere

bei denjenigen mit stressigen Alltags- und Berufssituationen oder neuen beruflichen Herausforderungen, wie dem Wiedereinstieg in das Berufsleben nach Elternzeit oder Umschulungen, Anklang finden. Attraktivität gewinnen die Tabletten dabei insbesondere durch eine einfache und schnelle Einnahme, eine leichtere Kontrolle der Einnahmehäufigkeit durch die Blisterverpackung sowie eine hohe Dosiergenauigkeit.

Des Weiteren könnte das Produkt in Tablettenform attraktiv für 65- bis 75-jährige sein, die am Beginn ihrer Rentenzeit stehen. Hopfen als Wirkstoffpflanze würde dabei vermutlich vorrangig Männer ansprechen, die bereits erste Defizite wahrnehmen bzw. mögliche Leistungsminderungen (noch) nicht akzeptieren wollen.

Der Preis von 40 Euro für eine Monatspackung ist relativ hoch. Damit spricht dieses Produktkonzept eher wohlhabendere Menschen an, welche entsprechende Finanzmittel für die Gesundheitsvorsorge haben (Werner 2021).

4.3.2.1.2.2 *Dragees*

Bei diesem Produktkonzept ist darauf zu achten, dass trotz fehlender Umverpackung alle notwendigen Informationen auf der Verpackung zu finden sind. Von einer abziehbaren Banderole raten die Experten dabei allerdings ab, da sich viele Verbraucher*innen mit dieser Technik schwertun. Eine bessere Variante könnte z. B. sein, einen Beipackzettel im Deckel unterzubringen und auf dem Etikett darauf hinzuweisen.

Hinsichtlich der zugesetzten B-Vitamine, welche für die Deklaration des Nahrungsergänzungsmittels von Vorteil sind, unterscheidet sich die Meinung der Experten. Als Pro-Argument wird eine mögliche Verbesserung der Wirkung angeführt. Als Contra-Argument wird aufgeführt, dass Verbraucher bereits Produkte mit zugesetzten B-Vitaminen zu sich nehmen könnten, was die Gefahr einer Überdosierung begünstige.

Um Spontankäufe zu fördern, könnten zu Beginn eher kleinere Packungen (für 1-2 Monate) angeboten werden. Wenn das Produkt einen höheren Bekanntheitsgrad erreicht, würden Verwendende auch größere Packungen kaufen.

Eine Vermarktung als Nahrungsergänzungsmittel sowie die Darreichungsform in Dragees machen das Produktkonzept B für eine große Bandbreite an Menschen attraktiv. Besonders relevante Produktattribute seien dabei die umweltfreundliche Verpackung, die einfache Einnahme, der geringere Preis sowie die emotionale Unterscheidung zu einem Arzneimittel. Ein Nahrungsergänzungsmittel ruft dabei das Gefühl hervor, etwas für sich und sein Wohlergehen zu tun und nicht aufgrund einer Krankheit zu handeln.

Angesprochen würden dadurch u. a. Schüler und Studierende sowie Berufstätige bis 65 Jahren, die mit Hilfe des Produkts ihre Konzentrations- und Gedächtnisleistung für bevorstehende Prüfungen bzw. die allgemeine Fähigkeit zur Bewältigung von Arbeit und Alltag unterstützen wollen.

Für einige Konsumenten könnte zudem das Bio-Siegel auf dem Produkt kaufentscheidend sein. Diese würden ein solches Produkt vor allem als Spontankauf ohne ausführliche vorherige Beratung erwerben (Werner 2021).

4.3.2.1.2.3 *Tropfen*

Bei den Tropfen sprechen sich die Experten für Veränderungen des Flaschen- und Umverpackungsdesigns aus. Eine graue Packung würde Konsumenten nicht ansprechen, wenn das Produkt zum freien Verkauf in Regalen zu finden sei. Die Flasche des entwickelten Produktkonzepts habe zu große Ähnlichkeiten mit den „Bachblütentropfen nach Dr. Bach“. Die Umverpackung sollte farbig und seriös gestaltet werden. Das Design der Flasche sollte mit dem Design der Umverpackung

abgestimmt werden. Außerdem sollte darauf geachtet werden, dass die Flasche neben der breiten Verschlusskappe auch eine größere Standfläche hat, um ein leichtes Umkippen zu vermeiden.

Statt einer Pipette, mit welcher die einzelnen Tropfen abzuzählen sind, sollte eine Dosierpumpe in das Konzept inkludiert werden. Das sei eine Voraussetzung, damit das Produkt als Arzneimittel zugelassen werden kann. Eine Dosierpumpe gewährleistet eine möglichst genaue Dosierung und dient einer leichteren Einnahme sowie sicheren Anwendbarkeit des Produkts.

Statt eines neutralen Geschmacks schätzen die Experten, komme ein eher kräutriger, tendenziell bitterer Geschmack besser bei Verbrauchern an. Der Geschmack des Alkohols, welcher zur Konservierung verwendet wird, würde vermutlich auch akzeptiert.

Die Nachfrage nach Tropfen wird von den Experten als insgesamt eher gering eingeschätzt. Das Produktkonzept ist laut Experten hauptsächlich für Menschen über 65 Jahren interessant. Diese würden meist schon verschiedene Tabletten nehmen, wodurch Tropfen Abwechslung wären. Zudem sind sie bei Schluckbeschwerden leichter einzunehmen als feste Tabletten oder Dragees. Allerdings gestalte sich die Einnahme als verhältnismäßig schwierig und fehleranfällig, wenn man den Prozess von Tropfenzählen oder Abmessen betrachte. Bei Alkohol ist zu beachten, dass dieser zwar ein sehr gutes Konservierungsmittel ist und die Reinheit des Produkts garantieren kann, sein Einsatz aber auch Verbrauchergruppen ausschließt, die auf diesen verzichten müssen oder wollen (Werner 2021).

4.3.2.1.2.4 Allgemeine Hinweise zur Vermarktung durch Experten

Eine Möglichkeit erste Kaufanreize zu generieren, kann Hinweisen der Experten zufolge, ein Angebot von Probierpackungen zu einem sehr geringen Preis (unter 10 Euro) sein. Diese könnten das Interesse potentieller Zielgruppen wecken und diese zum Kauf und Ausprobieren anregen. Dadurch würde es für diese möglich, die Verträglichkeit des Produkts zu testen, Erfahrungen zu sammeln und diese dann weitergeben zu können.

Dieses Vorgehen hatte bei vergleichbaren Produkten, wie beispielsweise den „Wick ZzzQuil Gute Nacht-Dragees“ bereits Erfolg gehabt. Die Wiederkauftrate der Konsumenten sei auf Grundlage der guten Erfahrungen sehr hoch.

Einige der Tiefeninterviewteilnehmer gaben an, sich neben den Pflichtangaben auf der Verpackung (Informationen zu Wechsel- und Nebenwirkungen) weitere Informationen zu Studien, Erfahrungsberichten und ähnlichem zu wünschen. Um diesem Wunsch trotz limitiertem Platz auf der Verpackung selbst möglichst nachzukommen, könnte mit Hilfe von QR-Codes auf diese Informationen verwiesen werden. Zudem könnten Beipackzettel und zusätzliches Informationsmaterial in die Verpackung integriert werden (z. B. Beipackzettel im Deckel beim Schraubglas bzw. mit in der Pappumverpackung von Blistern).

Die Mehrheit der interviewten Experten sieht das größte Vermarktungspotential im Produktkonzept B, d. h. dem Konzept als Nahrungsergänzungsmittel in Drageeform. Vorteile dieses Konzepts seien eine sichere und einfache Dosierung, eine lange Haltbarkeit sowie eine umweltfreundliche Verpackung aus Glas.

Für die Vermarktung eines solch innovativen Produktes zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung ist zudem zu beachten, dass in Apotheken die Pflicht besteht, zunächst etablierte Produkte, wie Ginkgo, Ginseng oder Rosenwurz mit einer dokumentierten Wirkung zu empfehlen. Eine Empfehlung für das neue Hopfenprodukt ist erst nach dem Vorliegen von Sicherheits- und Wirksamkeitsbelegen möglich. Eine genaue Abgrenzung zu den bereits etablierten pflanzlichen Produkten ist für die Experten dafür wichtig.

Weiterhin ist zu bedenken, dass Hopfen derzeit vor allem mit einer beruhigenden und schlaffördernden Wirkung assoziiert wird. Hier ist eine umfangreiche Marketingarbeit sowie viel Werbung notwendig, um

dem Konsumenten die Wirkung hinsichtlich der Konzentrations- und Gedächtnisleistungsunterstützung zu vermitteln. Über entsprechende Marketingmaßnahmen, die leichte Zugänglichkeit des Produkts und positive Erfahrungsberichte erster Konsumenten kann eine Assoziation von Hopfen mit der gedächtnis- und konzentrationsunterstützenden Wirkung aufgebaut und etabliert werden (Werner 2021).

Unter Abwägung der in Kapitel Erste Produktkonzepte und Zielgruppenbestimmung dargestellten Vor- und Nachteile der vorgestellten Produktkonzepte, wurde das Kernkonzept der Dragees als Basis für weitere Untersuchungen ausgewählt. Die Experten aus den Apotheken haben dieses als am erfolgversprechendsten eingeschätzt (Werner 2021). Festgelegt wurde dabei insbesondere die Darreichungsform. Andere Attribute beziehungsweise Attributausprägungen, wie beispielsweise die Zulassungsform oder die Verpackung, wurden im Rahmen des Forschungsvorhabens ebenfalls untersucht, deren Ergebnisse im folgenden Kapitel dargestellt werden.

4.4 Arbeitspaket 5: Vermarktungstest

Auf Basis der qualitativen Studien wurde eine deutschlandweit repräsentative Online-Erhebung mit Integration eines CBC-Experiments zur Definition des Umfangs und der Ansprüche potentieller Zielgruppen durchgeführt. Unter den 1707 Teilnehmenden der Online-Umfrage waren 1564 Personen (=91,6 %), die entweder schon Erfahrung in der Verwendung mit NHP haben oder sich eine zukünftige Einnahme vorstellen können. Aktuelle Nutzer sind jene, die angegeben haben, innerhalb der letzten 12 Monate NHP konsumiert zu haben. Nicht aktuelle Nutzer haben auch Erfahrung mit NHP, allerdings liegt deren letzte Verwendung mehr als 12 Monate zurück. Potentielle Nutzer haben bisher keine NHP verwendet, aber können sich eine zukünftige Nutzung vorstellen. NHP Ablehner haben keinerlei Erfahrung mit NHP und erwägen auch keine zukünftige Einnahme.

Tabelle 10. Soziodemographische Verteilung der Befragten hinsichtlich ihrer Nutzung von NHP, n=1707.

	Total, n=1707	Aktuelle NHP Nutzer, n=1229	Nicht aktuelle NHP Nutzer, n=235	Potentielle NHP Nutzer, n=120	NHP Ablehner, n=123
n (%)	100	72,0	13,8	7,0	7,2
Geschlecht					
Männlich (%)	46,9	39,5	62,1	67,5	71,5
Weiblich (%)	53,1	60,5	37,9	32,5	28,5
Alter (in Jahren)					
18-29 (%)	14,6	16,6	10,8	7,5	9,4
30-39 (%)	13,9	16,4	7,8	5	9,4
40-49 (%)	13,9	14,2	18,2	10	7,1
50-59 (%)	20,7	20,4	22,9	21,7	18,9
60+ (%)	36,8	32,4	40,3	55,8	55,1
Schulbildung					
< 12 Jahre (%)	49,6	46,3	55,7	64,2	56,9
12 Jahre und mehr (%)	50,4	53,7	44,3	35,8	43,1
Beschäftigungsverhältnis					
Erwerbstätig (%)	62,9	66,3	61,7	50	43,9
Nicht erwerbstätig (%)	37,1	33,7	38,3	50	56,1
Krankenversicherung					
Gesetzlich (%)	77	76,6	71,9	85	82,1
Privat (%)	23	23,4	28,1	15	17,9
Haushaltsnettoeinkommen (€)					
<900 (%)	5,5	4,6	4,7	10	11,4
900-1499 (%)	14,5	13,7	14,9	18,3	17,9
1500-2599 (%)	27,1	27,1	26	25	30,9
2600-3599 (%)	18,1	18,7	21,7	13,3	9,8
3600-4999 (%)	18	18,6	17,4	16,7	14,6
>5000 (%)	7	7,2	6,4	5,8	6,5
Keine Angabe (%)	9,8	10	8,9	10,8	8,9

Tabelle 10 zeigt, wie sich die angezeigten soziodemographischen Charakteristika innerhalb der einzelnen Nutzergruppen verteilen (in Prozent). Die Mehrheit der aktuellen NHP-Nutzer ist weiblich und mittleren Alters zwischen 30 und 59 Jahren, was mit anderen Studien übereinstimmt (Welz et al. 2019a; Kempainen et al. 2018)

Die Tabelle 11 zeigt zudem, wie sich die Nutzergruppen innerhalb der einzelnen Bundesländer verteilen, wie groß der Wohnort ist und ob sie eher städtisch oder ländlich wohnen. Auffällig ist der verhältnismäßig hohe Anteil an NHP Ablehnern in den Bundesländern Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und Thüringen. Die meisten (aktuellen und nicht aktuellen) NHP-Nutzer wohnen in Nordrhein-Westfalen und Bayern. Potentielle Nutzer und Ablehner wohnen eher städtisch in mittelgroßen Städten.

Tabelle 11. Wohnortverteilung der Teilnehmenden der ersten Onlinestudie in Abhängigkeit von deren NHP-Nutzung.

Total, n=1707 (100%)	Aktuelle NHP Nutzer, n=1229	Nicht aktuelle NHP Nutzer, n=235	Potentielle NHP Nutzer, n=120	NHP Ablehner, n=123
n (%)	72,0	13,8	7,0	7,2
Bundesland				
Bayern (%)	17,5	15,3	20	13,8
Baden-Württemberg (%)	13,6	15,3	8,3	10,6
Berlin (%)	4,0	4,7	5,0	2,4
Brandenburg (%)	3,5	2,1	1,7	3,3
Bremen (%)	1,1	1,3	0,0	0,0
Hamburg (%)	2,6	3,0	0,8	0,0
Hessen (%)	6,6	8,1	4,2	8,9
Mecklenburg-Vorpommern (%)	1,9	0,4	2,5	4,9
Niedersachsen (%)	10,1	8,1	6,7	9,8
Nordrhein-Westfalen (%)	20,1	20,9	24,2	22,8
Rheinland-Pfalz (%)	4,6	6,4	5,8	3,3
Saarland (%)	1,4	0,9	0,0	1,6
Sachsen (%)	5,1	3,8	8,3	4,1
Sachsen-Anhalt (%)	2,2	3,4	5,0	7,3
Schleswig-Holstein (%)	3,0	4,7	5,0	3,3
Thüringen (%)	2,8	1,7	2,5	4,1
Ortsgröße				
< 5.000 (%)	14,6	16,2	13,3	13,0
5.000 - <20.000 (%)	27,5	27,7	21,7	30,1
20.000 - <100.000 (%)	26,1	23,4	35,0	33,3
100.000 - <500.000 (%)	14,5	15,7	19,2	16,3
500.000 + (%)	17,2	17,0	10,8	7,3
Stadt/Land				
städtisch (%)	55,4	55,3	65,8	61,0
ländlich (%)	44,6	44,7	34,2	39,0

4.4.1 CBC-Experiment

Bei einem CBC-Experiment handelt es sich um eine Methode zur Identifizierung von Verbraucherpräferenzen, bei welcher Produktkonzepte und ihre Attribute verglichen werden können. Durch eine simulierte Kaufsituation können in der CBC-Analyse die Wichtigkeiten von den in die Untersuchung einfließenden Produktattributen identifiziert werden (Sawtooth Software 2022).

Am Umfrage-Teil mit dem CBC-Experiment haben nur Teilnehmende, die Erfahrung mit der Verwendung von NHP haben (aktuelle NHP-Nutzer, nicht aktuelle NHP-Nutzer) sowie potentielle Verwender, die bisher keine Erfahrung mit NHP haben (Vergleich Tabelle 10 und Tabelle 11), teilgenommen. Ablehner von NHP haben die Fragen im CBC-Teil nicht beantwortet. Das CBC-Experiment beinhaltete sieben Auswahlentscheidungen. In jeder Auswahlentscheidung entschieden sich die Teilnehmenden zwischen drei verschiedenen Produktkonzepten mit verschiedenen Eigenschaftsausprägungen der Attribute und einer „None-Option“ (wenn sie keines der vorgestellten Produktkonzepte für einen Kauf in Erwägung ziehen würden).

Die Schätzung der Parameter auf Basis der CBC-Daten erfolgte mit Hilfe der Sawtooth Software Lighthouse Studio 9.13.1 mittels eines Hierarchical-Bayes-Ansatzes. Dabei wird ein iterativer Ansatz zur Schätzung der Parameter β_i (Vektor der Teilnutzenwerte des *iten* Individuums), α (Vektor der Mittelwerte der Verteilung der individuellen Teilnutzenwerte) und D (Matrix der Varianzen und Kovarianzen der Teilnutzenwerte über Individuen hinweg) verwendet (Sawtooth Software 2013). Alle Variablen, aufgelistet in Tabelle 12, gingen diskret und effekt-kodiert in die Schätzung ein.

„Hierarchische“ Modelle können als modular bzw. mit Hilfe von Submodellen beschrieben werden (Allenby et al. 2005). Sie werden im Marketing-Kontext herangezogen, um beispielsweise individuelles Verhalten zu modellieren. Dabei ist es üblich, dass ein das individuelle Verhalten beschreibendes Submodell mit einem die Heterogenität der individuellen Beobachtungen beschreibenden Submodell kombiniert wird. Das bietet den Vorteil, dass Informationen aus der gesamten Stichprobe wenige Information auf individueller Ebene ergänzen können (Wirth 2010).

Die Überprüfung der Konvergenz der HB-Modelle erfolgte mittels des RLH- (root-likelihood) Werts. Er bildet den geometrischen Mittelwert der vorhergesagten Wahrscheinlichkeiten ab. Da sich die Teilnehmenden in jedem Durchlauf zwischen 4 Auswahlmöglichkeiten entschieden haben, würde pro Durchlauf jede Auswahloption mit einer Wahrscheinlichkeit von 25% gewählt werden. Das entspricht einem RLH-Wert von 0,25 (Sawtooth Software 2013). Der RLH-Wert der Umfrage beträgt 0,691. Damit ist die Schätzung des Modells deutlich besser als bei einem Zufallsmodell ($0,691 > 0,25$).

Abbildung 40 zeigt beispielhaft, wie eine Entscheidungssituation im CBC-Experiment für die Teilnehmenden der Online-Umfrage aussah.

Wenn Ihnen diese Produktvarianten zur Auswahl stehen, für welches Produkt würden Sie sich entscheiden?
(5 of 7)

	Option 1	Option 2	Option 3
Verpackung	 Braunglas mit Schraubverschluss	 Blister	 Blaues Glas mit Schraubverschluss
Umverpackung/ Design	 rot-blau	 grün	 weiß
Art	frei verkäufliches pflanzliches Arzneimittel	Nahrungs-ergänzungsmittel	Nahrungs-ergänzungsmittel
Wechselwirkungen	mit Alkohol	keine	mit anderen Medikamenten
Vegan	ja	keine Angabe	keine Angabe
Preis	39,99 €	9,99 €	19,99 €
Erwerbort	Apotheke	Drogerie	Drogerie
	<input type="button" value="auswählen"/>	<input type="button" value="auswählen"/>	<input type="button" value="auswählen"/>
Option 4			
Ich würde keines der angebotenen Produkte auswählen.			
<input type="button" value="auswählen"/>			

Abbildung 40. Layout des CBC-Experiments.

Die folgende Tabelle 12 listet alle in dem Vermarktungstest untersuchten Produktattribute und ihre Ausprägungen auf. Diese wurden auf Basis der Ergebnisse der qualitativen Untersuchungen dieses Forschungsvorhabens (siehe Verbraucheransprüche Produktattribute) ausgewählt.

Tabelle 12. Untersuchte Produkteigenschaften und ihre Ausprägungen (angelehnt an Werner 2022).

Produktattribut	Ausprägungen
Verpackung	<ul style="list-style-type: none"> - Blister - Braunglas - Blaues Glas
Umverpackung	<ul style="list-style-type: none"> - Ohne - Weiß - Grün - Blau-rot
Zulassungsform	<ul style="list-style-type: none"> - Freiverkäufliches Arzneimittel - Nahrungsergänzungsmittel
Wechselwirkungen	<ul style="list-style-type: none"> - Keine - Mit Alkohol - Mit Medikamenten
Vegan	<ul style="list-style-type: none"> - Ja - Keine Angabe
Preis*	<ul style="list-style-type: none"> - 9,99 € - 19,99 € - 39,99 €
Erwerbort	<ul style="list-style-type: none"> - Apotheke - Drogerie - Online

*für eine Packung mit 100 Dragees

Zusätzlich zum CBC-Experiment wurden die Studienteilnehmer in der Befragung auch gefragt, ob sie einen Zusatz von B-Vitaminen zu einem solchen Produkt in hochdosierter Form oder in Tagesdosismenge bevorzugen bzw. einen Zusatz von Vitaminen ablehnen.

4.4.2 Ergebnisse des CBC-Experiments

Die Ergebnisse der Schätzung zeigen, dass der Preis für die meisten potentiellen Verwender des Hopfenprodukts die größte Wichtigkeit bei der Konsumententscheidung spielt. Wie aus Abbildung 41 zu entnehmen, haben Wechselwirkungen die zweithöchste mittlere Wichtigkeit, gefolgt vom Erwerbort. Die mittleren Wichtigkeiten von Verpackung und Umverpackung sowie der Zulassungsform unterscheiden sich in weniger als einen Prozentpunkt. Ob das Produkt als vegan deklariert wird, ist das am wenigsten wichtige Entscheidungskriterium.

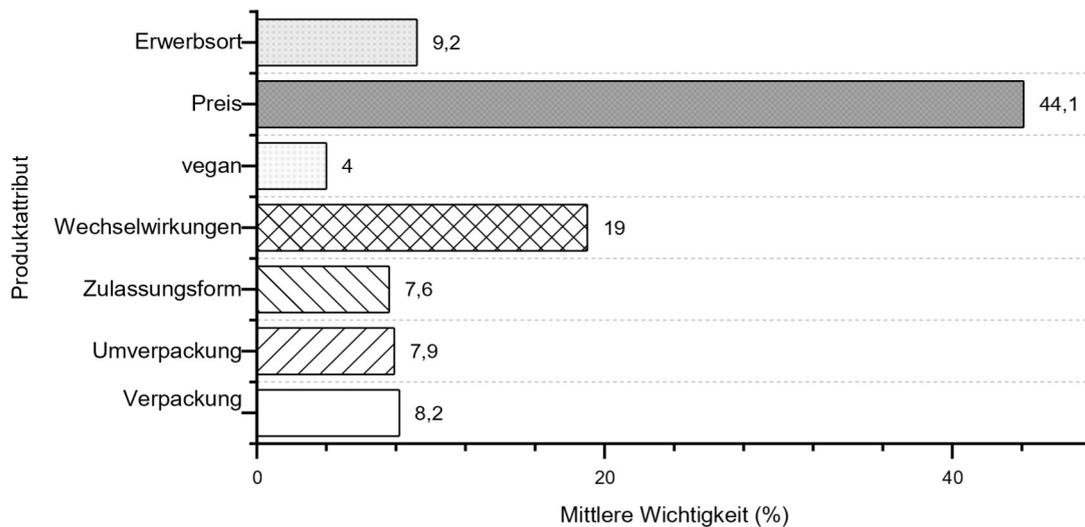


Abbildung 41. Mittlere Wichtigkeiten der Produktattribute im Auswahlexperiment (in %), n=1584, nach Werner 2022.

Abbildung 42 zeigt die durchschnittlichen Nutzenwerte der einzelnen Produktattributsausprägungen. Dabei wird deutlich, dass Verbraucher generell einen günstigen Preis bevorzugen und den teuren Preis von 39,99 € am stärksten ablehnen. Dieses Ergebnis stützt die Erkenntnis einer vorherigen Studie, bei welcher eine Preisbereitschaft zwischen drei und fünfzehn Euro für ein vergleichbares Produkt ermittelt wurde (Aschenbrenner 2018). Zudem wird ein positiver Nutzen darin gesehen, wenn das Produkt keine Wechselwirkungen z. B. mit Alkohol oder Medikamenten aufweist. Bei der Verpackung gibt es eine leichte Tendenz zum blauen Glas. Der Nutzenwert der Umverpackung ist am größten, wenn diese weggelassen wird, d. h. das Produkt ohne Umverpackung verkauft wird. Mit Umverpackung würde die Farbe Grün am ehesten bevorzugt. Die präferierten Farben der Verpackung stehen im Einklang mit anderen präferierten Attributsausprägungen wie dem Preis. So werden grüne Verpackungen mit einem eher niedrigen Preis assoziiert. Sowohl die Farbe Grün als auch die Farbe Blau werden zudem mit mehr Sicherheit bzw. damit, dass bei der Einnahme des Gesundheitsproduktes weniger Vorsicht erforderlich sei, verbunden (Rouillet und Droulers 2005). Die Apotheke als Erwerbssort erfährt die größte Zustimmung, ein Erwerb über das Internet vergleichsweise die größte Ablehnung. Entgegen der Experteneinschätzung zeigt sich eine klare Präferenz der Verbraucher zu einem als pflanzliches Arzneimittel zugelassenem Produkt (Werner 2022).

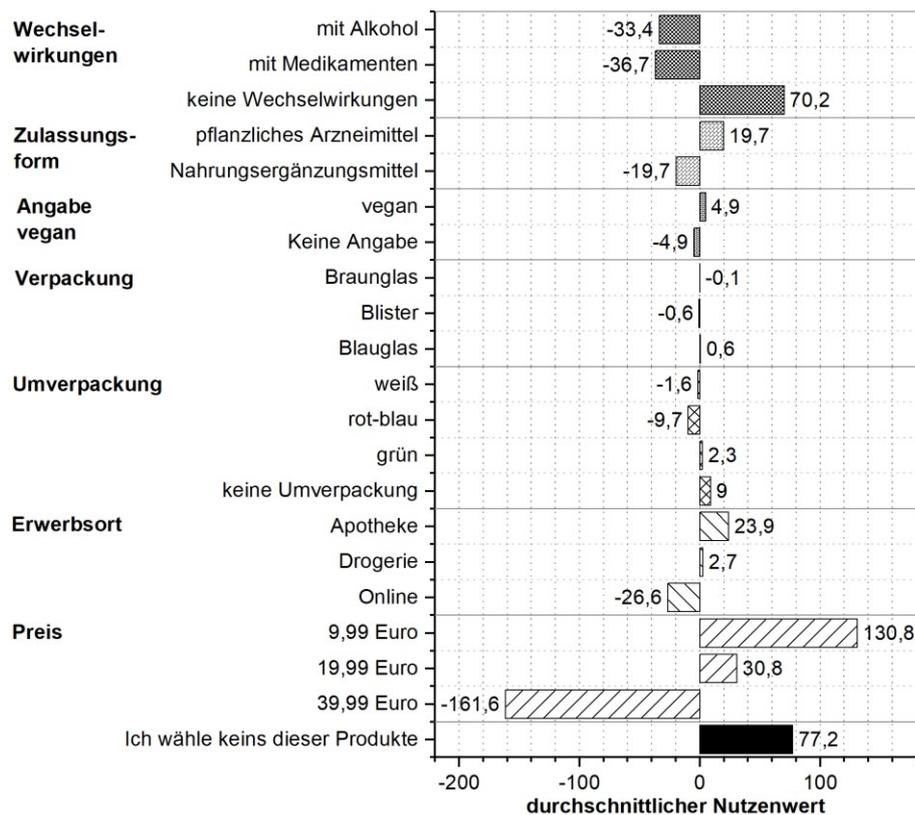


Abbildung 42. Durchschnittliche Nutzenwerte der einzelnen Produktattribut-Ausprägungen (Cero-zentreded Diffes) (Werner 2022).

Entsprechend der Ergebnisse des CBC-Experiments hat damit ein Produktkonzept mit blauem Glas ohne Umverpackung, zugelassen als pflanzliches Arzneimittel, ohne Wechselwirkungen, ausgezeichnet als vegan, zu einem günstigen Preis (9,99 €) und wenn das Produkt in Apotheken vermarktet wird, das größte Vermarktungspotential.

Beachtet man den unteren Balken in Abbildung 42 fällt zudem auf, dass ein relativ hoher Nutzenwert auch auf die None-Option fällt, d. h. ein größerer Teil der Teilnehmer der Studie hat alle vorgeschlagenen Produktkonzepte lieber abgelehnt, als eines auszuwählen. Das spricht dafür, dass die Verbrauchereinschätzungen hinsichtlich des neu entwickelten Hopfenpräparates zur Steigerung der Konzentrations- und Gedächtnisleistung nicht einheitlich sind, sondern zwischen Gruppen von Verbrauchern differieren.

Um mögliche Verbrauchergruppen genauer zu ermitteln, wurde auf Basis der CBC-Daten zudem eine Latent Class-Analyse durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode können Gruppen von Konsumenten identifiziert werden, die ähnliche Präferenzstrukturen haben (Sawtooth Software 2021).

Für die Marktsegmentierung wurde zunächst die Anzahl der Verbrauchergruppen bestimmt. Wichtig dabei war eine relativ gleichmäßige Verteilung der Gruppengrößen sowie eine möglichst große Homogenität innerhalb der Gruppen, die sich untereinander gleichzeitig möglichst heterogen gestalten. Dies war bei unserem Forschungsprojekt bei der 6-Gruppenlösung der Fall. Wie sich die mittleren Wichtigkeiten der Produktattribute gegeneinander und deren durchschnittlichen Nutzenwerte ihrer Ausprägungen untereinander innerhalb der einzelnen Gruppen gestalten, ist Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13. Marktsegmentierung, mittlere Wichtigkeiten der Produktattribute und Nutzenwerte der Attributausprägungen innerhalb von 6 Gruppen, n=1587 (Werner 2022).

Eigenschaft und Eigenschaftsausprägung	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6	Total
Segmentgröße (%)	13,5	8,2	21,1	21,9	24,4	10,9	100,0
n	214	130	335	348	387	173	15
<u>Durchschnittliche Wichtigkeit der Attribute</u>							
Verpackung (%)	3,5	38,6	3,0	0,8	13,2	3,6	8,3
Umverpackung (%)	32,5	14,5	5,0	0,9	11,7	7,4	7,9
Zulassungsform (%)	2,7	7,6	11,3	0,9	6,1	0,2	7,6
Wechselwirkungen (%)	12,0	5,3	12,8	2,2	19,6	51,9	19,0
Vegan (%)	3,8	4,0	3,5	0,3	5,4	0,8	4,0
Preis (%)	6,1	29,0	52,0	93,6	27,6	33,0	44,1
Erwerbort (%)	39,5	1,0	12,6	1,2	16,4	3,0	9,2
<u>Durchschnittlicher Nutzenwert</u>							
Verpackung							
Braunglas	-14,7	-73,4	6,2	1,4	7,2	5,5	-0,1
Blister	4,6	171,9	-13,4	-3,6	-49,7	9,8	-0,6
Blaues Glas	10,0	-98,5	7,2	2,3	42,5	-15,3	0,6
Umverpackung							
Weiß	68,6	1,5	8,6	-0,2	-41,6	6,8	-1,6
Rot-Blau	-158,6	-18,0	-11,2	-3,7	-6,5	-0,5	-9,7
Ohne	39,6	-42,5	18,5	1,7	40,0	22,8	9,0
Grün	50,4	59,1	-16,0	2,2	8,1	-29,1	2,3
Zulassungsform							
Freiverkäufliches Arzneimittel	9,3	26,7	39,4	3,2	21,4	0,8	19,7
Nahrungsergänzungsmittel	-9,3	-26,7	-39,4	-3,2	-21,4	-0,8	-19,7
Wechselwirkungen							
Mit Alkohol	-6,0	-16,0	-35,0	0,5	-40,4	-100,5	-33,4
Keine	44,8	-4,8	54,4	7,4	88,7	232,0	70,2
Mit anderen Medikamenten	-38,8	20,8	-19,3	-8,0	-48,3	-131,5	-36,7
Vegan							
Ja	13,4	-14,2	12,1	1,1	19,0	-2,9	4,9
Keine Angabe	-13,4	14,2	-12,1	-1,1	-19,0	2,9	-4,9
Preis							
9,99€	19,5	87,0	168,0	235,5	46,8	100,6	130,8
19,99€	-23,4	29,1	28,2	184,5	73,2	29,9	30,8
39,99€	4,0	-116,0	-196,2	-420,0	-120,0	-130,4	-161,6
Erwerbort							
Apotheke	-183,2	-0,4	38,2	2,6	63,9	8,0	23,9
Drogerie	93,0	3,5	11,7	3,0	-12,8	5,2	2,7
Online	90,2	-3,0	-49,9	-5,7	-51,1	-13,1	-26,6
None-Option	264,5	-28,2	201,5	174,8	-369,3	117,1	77,2

Es fällt auf, dass alle Gruppen der Zulassung als pflanzliches Arzneimittel einen höheren Nutzenwert zuweisen als der Zulassung als Nahrungsergänzungsmittel. Zudem wird eine rot-blaue Umverpackung von allen Gruppen abgelehnt. Der niedrigste Preis weist ebenfalls bei allen Gruppen einen positiven Nutzenwert auf, auch wenn der mittlere Preis bei Gruppe 4 noch einen höheren Nutzenwert aufweist. Die

Gruppen 2 und 5 haben einen negativen Nutzenwert bei der None-Option, d. h. nur diese beiden Gruppen sehen einen höheren Nutzen in der Auswahl eines der Produktkonzepte als in der Entscheidung für keine der angebotenen Alternativen. Damit rücken diese beiden Gruppen als mögliche Zielgruppen für ein NHPCC näher in den Fokus.

Gruppe 2 ist mit 130 Personen die kleinste der sechs Gruppen. Ihre Präferenzen unterscheiden sich deutlich von dem optimalen gruppenübergreifenden Produktkonzept. Besonders wichtig ist den Menschen in dieser Gruppe die Verpackung (38,6 %), deren Nutzenwert am höchsten ist, wenn die Dragees in Blistern vermarktet werden. Dazu passend lehnen sie Glas als Verpackung ab und geben auch der Umverpackung eine überdurchschnittliche Wichtigkeit (14,5 %). Bevorzugt wird dabei eine Umverpackung in Grüntönen (59,1). Ein weiteres Alleinstellungsmerkmal ist, dass die Gruppe „Wechselwirkungen mit anderen Medikamenten“ toleriert und dieser Option sogar einen höheren Nutzenwert (20,8) zuweist, als der Option „Ohne Wechselwirkungen“ (-4,8) (Werner 2022).

Mit 387 Personen ist Gruppe 5 die größte der sechs Gruppen. Die mittleren Wichtigkeiten der Produktattribute verteilen sich hier stärker, als bei den meisten anderen Gruppen. Der Preis hat innerhalb der Gruppe zwar die größte Wichtigkeit (27,6 %), ist im Vergleich zu anderen Gruppen aber unterdurchschnittlich relevant. Eine Besonderheit den Preis betreffend ist der innerhalb der Gruppe vergleichsweise höchste Nutzenwert (73,2) im mittleren Preissegment (19,99 €). Im Gruppenvergleich überdurchschnittlich wichtig ist den Personen in Gruppe 5, dass das Produkt als vegan deklariert ist (5,4 %). Bis auf den größeren mittleren Nutzen des NHP im mittleren Preissegment statt dem niedrigerem unterscheiden sich die präferierten Produktausprägungen nicht von jenen aus dem gruppenübergreifenden Produktkonzept. Die Menschen in dieser Gruppe präferieren die Dragees in blauem Glas ohne Umverpackung, möchten keine Wechselwirkungen und bevorzugen es vegan als pflanzliches Arzneimittel, das in der Apotheke zu erwerben ist (Werner 2022).

Die nachfolgende Tabelle 14 zeigt, wie sich ausgewählte soziodemographische Merkmale innerhalb der beiden möglichen Zielgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 5) verteilen. Während das Geschlechterverhältnis in Gruppe 2 relativ ausgeglichen ist, sind in Gruppe 5 mit 58,5 % etwas mehr Frauen als Männer vertreten. Knapp über die Hälfte der Personen in Gruppe 2 ist über 50 Jahre alt. In Gruppe 5 sind über 55 % der Personen unter 50 Jahre alt. In beiden Gruppen ist eine Mehrheit gesetzlich krankenversichert, wobei der Anteil mit 28,8 % an privatversicherten Personen in Gruppe 2 etwas höher ist, als mit 25,1 % in Gruppe 5. Bezüglich des Wohnorts sind 89 % der Personen aus Gruppe 2 in westdeutschen Bundesländern ansässig. 44,1 % wohnen eher städtisch. In Gruppe 5 ist es umgekehrt. Hier leben 56,9 % in einer städtischen Umgebung, 16,7 % wohnen in ostdeutschen Bundesländern.

Teilnehmende, die innerhalb der letzten 12 Monate oder davor NHP konsumiert haben, wurden nach ihrem Konsumverhalten gefragt. Eine Mehrheit, über 85 % aus beiden Gruppen, gab an, NHP schon in Selbstmedikation genommen zu haben, d.h. nicht auf Empfehlung von medizinischem Fachpersonal. Ebenso über 80 % der Verwender in beiden Gruppen gaben an, Erfahrung mit pflanzlichen Arzneimitteln zu haben. Mehr als die Hälfte der Verwender in Gruppe 2 haben zudem schon natürliche Nahrungsergänzungsmittel zu sich genommen. In Gruppe 5 sind es mit 46,1 % weniger als die Hälfte aller NHP-Verwender.

Tabelle 14. Charakteristika der beiden möglichen Zielgruppen (Gruppe 2 und Gruppe 5), n=508.

n = 508	Gruppe 2 n = 130	Gruppe 5 n = 387
n (%)	100	100
Geschlecht		
Männlich (%)	49,2	41,5
Weiblich (%)	50,8	58,5
Alter (in Jahren)		
18-29 (%)	18,6	19
30-39 (%)	17,8	19,5
40-49 (%)	12,7	14,9
50-59 (%)	19,5	14,4
60+ (%)	31,4	32,3
Krankenversicherung		
Gesetzlich (%)	71,2	74,9
Privat (%)	28,8	25,1
Bundesland		
West (%)	89	83,3
Ost (%)	11	16,7
Wohnort Stadt/Land		
Städtisch (%)	44,1	56,9
Ländlich (%)	55,9	46,1
Haushaltsnettoeinkommen (€)		
<900 (%)	2,5	4,1
900-1499 (%)	16,9	11,8
1500-2599 (%)	23,8	23,9
2600-3599 (%)	21,2	19,7
3600-4999 (%)	20,3	22,3
>5000 (%)	9,3	8,2
Keine Angabe (%)	5,9	10
NHP in Selbstmediation* (%)	85,2	85,1
Verwendung von pflanzlichen Arzneimitteln* (%)	82,2	81,3
Verwendung von natürlichen Nahrungsergänzungsmitteln* (%)	55,9	46,1

*n=477, Frage wurde nur von Teilnehmenden mit NHP-Erfahrung (aktuelle und nicht aktuelle NHP Nutzer) beantwortet

Zum Unterstützen beziehungsweise zum Erhalt der eigenen Gesundheit sind bzw. wären die meisten Menschen aus den beiden identifizierten Gruppen bereit NHP zu verwenden. Auch zur Behandlung von Symptomen oder Krankheiten können sich über Zweidrittel der Personen in beiden Gruppen vorstellen, NHP zu verwenden bzw. nutzen sie dafür. Der Anteil zur Unterstützung/Erhaltung von Gesundheit ist in Gruppe 2 etwas höher als in Gruppe 5. Umgekehrt ist der Anteil von Menschen mit dem Motiv Symptome/Krankheiten mit NHP zu behandeln in Gruppe 5 geringfügig höher. Das Motiv Krankheiten mit NHP vorbeugen zu wollen, wurde in beiden Gruppen am wenigsten genannt. Nichtsdestotrotz gaben in beiden Gruppen über die Hälfte der Teilnehmenden an, auch dieses Ziel mit dem Konsum von NHP zu verfolgen (siehe Abbildung 43).

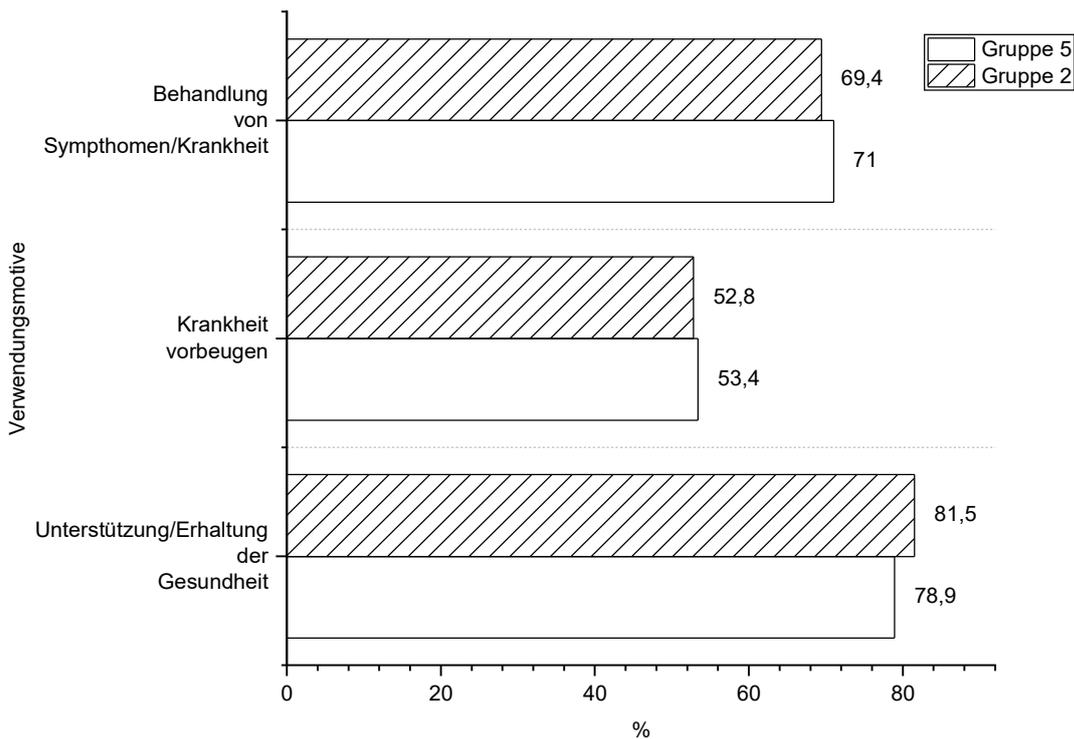


Abbildung 43. Motive, warum Personen aus Gruppe 2 (n=118) und Gruppe 5 (n=390) NHP verwenden bzw. bereit sind zu verwenden.

4.4.3 Ergänzende Ergebnisse: Zulassungsform und Vitamin-B-Zusatz

Nach dem CBC-Experiment konnten die Teilnehmenden unabhängig von der Auswahl im CBC-Prozess angeben, in welcher Darreichungsform sie sich das neue NHPCC gut vorstellen könnten. Übereinstimmend mit dem Ergebnis des CBC-Experiments gaben die meisten (80,1 %) an, sich das NHPCC als freiverkäufliches pflanzliches Arzneimittel gut vorstellen zu können, gefolgt von 71,2 % als Nahrungsergänzungsmittel (Mehrfachantworten waren möglich). Deutlich weniger Teilnehmende (< 55 %) könnten sich eine Zulassungsform als verschreibungspflichtiges pflanzliches Arzneimittel oder als Funktionelles Lebensmittel vorstellen. Einen Zusatz von B-Vitaminen dosiert auf den Tagesbedarf wäre für 41,7 % der Teilnehmenden attraktiv, hochdosiert für 10,7 % der Teilnehmenden. 18,3 % lehnen einen B-Vitamin-Zusatz ab, 29,3 % haben bezüglich der B-Vitamine keine Präferenz. In der Umsetzung des Produkts ist zu beachten, dass ein Zusatz von B-Vitaminen nur bei einer Zulassung als Nahrungsergänzungsmittel erlaubt wäre, nicht aber bei einer Zulassung als pflanzliches Arzneimittel. Berücksichtigt man die relativ niedrige mittlere Wichtigkeit der Zulassungsform und den vergleichsweise hohen Anteil an Teilnehmenden, die sich einen Vitamin-B Zusatz in Tagesdosis wünschen würden, könnte das Produktkonzept mit der Zulassungsform Nahrungsergänzungsmittel, wie von den Apothekern in den Experteninterviews angedeutet, erfolgsversprechend sein.

Ein Vorteil dieser Option wäre dabei die nachgewiesene Wirkung der Unterstützung von Gedächtnis- und Konzentrationsleistung von Vitamin B1, B6 und B12. Würden diese dem Gesundheitsprodukt als Nahrungsergänzungsmittel zugesetzt, dürfte das Produkt auch ohne aufwendig durchgeführte Studiennachweise einer sicheren Wirksamkeit des Hopfenextraktes als gedächtnis- und konzentrationsunterstützend deklariert werden (Nahrungsergänzungsmittelverordnung-NemV, Fassung der Bekanntmachung vom 24. Mai 2004 (BGBl. I S. 1011), zuletzt geändert durch Art. 11 VO

zur Anpassung nationaler Rechtsvorschriften an die Verordnung (EU), Nr. 1169/2011 betreffend die Information der Verbraucher über Lebensmittel vom 5.7.2017 (BGBl. I S. 2272)).

4.4.4 Validierung des Produktkonzepts via weiterer Online-Umfrage

Um weitere Erkenntnisse zum Vermarktungspotential und zur Optimierung des auf Basis der bereits gewonnenen und zuvor beschriebenen Ergebnisse abgeleiteten Produktkonzepts zu erlangen, wurde im November 2022 eine weitere Online-Umfrage mit 2108 Teilnehmenden durchgeführt. Die Rekrutierung erfolgte über ein externes Marktforschungsunternehmen. Die Datenauswertung erfolgte mittels der Software SPSS V29. Alle Teilnehmer wurden über die Ziele der Studie vorab aufgeklärt und gaben eine informierte Einwilligungserklärung ab.

Vorrangiges Ziel dieser Umfrage war es, Erkenntnisse zu bisher nicht näher untersuchten Attributausprägungen, wie z. B. dem Geschmack, zu gewinnen.

1819 Teilnehmende beantworteten den Fragebogen vollständig und in einer angemessenen Mindestzeit. Die nachfolgende Tabelle 15 zeigt die soziodemographischen Eigenschaften dieser Probanden.

Tabelle 15. Soziodemographische Daten der Teilnehmenden aus der zweiten Online-Umfrage.

	Anzahl Teilnehmer	Anteil in %
n	1819	100
Geschlecht		
Männlich	773	42,5
Weiblich	1046	57,5
Alter (in Jahren)		
18-29	303	16,7
30-39	359	19,7
40-49	327	18
50-64	543	29,9
65+	287	15,8
Schulbildung		
< 12 Jahre	852	46,8
12 Jahre und mehr	967	53,2
Nettoeinkommen in € (Haushalt)		
< 1000	172	9,5
1000 - < 3000	793	43,6
3000 - < 5000	543	30,2
5000 und mehr	151	8,3
Keine Angabe	64	3,5

Mit 57,5 % haben insgesamt mehr Frauen an der Umfrage teilgenommen als Männer. Eine Mehrheit von 43,6 % gab ein Nettohaushaltseinkommen zwischen 1000 und unter 3000 € an, gefolgt von 30,2 % mit einem Nettohaushaltseinkommen zwischen 3000 und unter 5000 €.

Die Fragen in der Online-Erhebung bezogen sich auf ein neues, freiverkäufliches pflanzliches Arzneimittel mit einem Hopfenextrakt, welches die Gedächtnis- und Konzentrationsleistung unterstützen kann. In der Produktbeschreibung (siehe Abbildung 44) wurde erwähnt, dass wissenschaftliche Studien die Erneuerung und den Schutz von Nervenzellen, bzw. deren Unterstützung durch das Hopfenextrakt, bestätigen konnten. Das Produkt würde keine tierischen Inhaltsstoffe beinhalten (d. h. vegan sein) und in Dragee-Form vorliegen. Wechsel- und Nebenwirkungen seien für das pflanzliche Arzneimittel keine bekannt.

Im folgenden Abschnitt stellen wir Ihnen einige Fragen zu einem neuen pflanzlichen Arzneimittel.

Stellen Sie sich bitte folgende Situation vor:

Es gibt ein neues, freiverkäufliches pflanzliches Arzneimittel, das die Gedächtnis- und Konzentrationsleistung unterstützen kann. Hierfür enthält das Produkt ein Pflanzenextrakt aus Hopfen. Wissenschaftliche Studien haben gezeigt, dass dieses Hopfenextrakt den Schutz und die Erneuerung von Nervenzellen unterstützen kann.



Das pflanzliche Arzneimittel gibt es in Dragee-Form. Neben- und Wechselwirkungen sind keine bekannt. Es beinhaltet keine tierischen Inhaltsstoffe.

Weiter

Abbildung 44. Einleitungstext, wie ihn die Probanden in der Online-Umfrage gesehen haben (n=1819).

Auf die Frage, welchen Geschmack die Umfrageteilnehmenden für das beschriebene Produkt bevorzugen würden, gaben über die Hälfte (57,7 %) einen neutralen Geschmack an (siehe Abbildung 45). Etwas mehr als ein Viertel der Teilnehmenden (27,4 %) würden einen süßlichen Geschmack präferieren, die wenigsten (3,6 %) einen bitteren Geschmack. Für 11,3 % wäre der Geschmack egal.

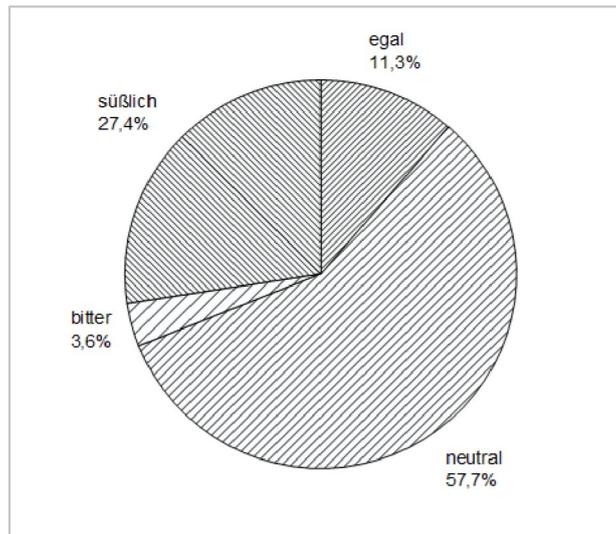


Abbildung 45. Bevorzugter Geschmack (n=1819).

Die Darreichungsform als Dragee würde es, wie bei Tabletten oder Pillen, erlauben, einen möglicherweise natürlich bitteren Geschmack einzukapseln. Das ist eine effektive Methode, um den zumeist auch von Erwachsenen nicht-erwünschten bitteren Geschmack zu vermeiden. Für Zielgruppen mit Schluckschwierigkeiten oder -einschränkungen, wie beispielsweise kleinen Kindern, wäre diese feste Darreichungsform allerdings ungeeignet (Mennella et al. 2013).

Eine Mehrheit von 72,7 % der Teilnehmenden gab an, Interesse daran zu haben, das beschriebene Produkt kostenlos und unverbindlich auszuprobieren. Lediglich 14,6 % würden das Produkt nicht ausprobieren wollen, 12,7 % waren sich nicht sicher. Wenn es darum geht, das Produkt käuflich zu erwerben, wären 32,1 % der Teilnehmenden bereit, bis zu 10 € für eine Packung mit einem Inhalt von 100 Dragees auszugeben (siehe Abbildung 46).

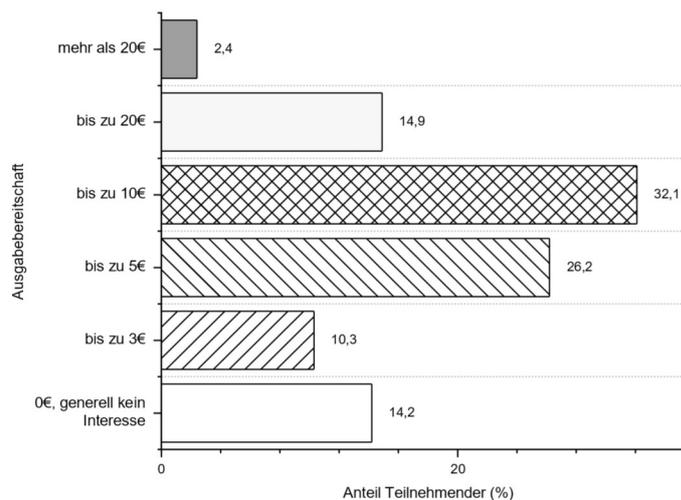


Abbildung 46. Ausgabebereitschaft für das Produkt in einer Verpackung mit einem Inhalt von 100 Dragees (n=1819).

Über ein Viertel (26,2 %) wären bereit, bis zu 5 € zu bezahlen. Ein Produkt zwischen 5 € und 10 € könnte also bei mehr als der Hälfte der Teilnehmenden (58,3 %) in Erwägung gezogen werden. Das Ergebnis bestätigt das Resultat aus dem CBC-Experiment, bei dem der niedrige Preis von 9,99 € durchschnittlich den größten Nutzenwert aufwies.

Wenn die Teilnehmenden die Auswahl zwischen verschiedenen Verpackungsmöglichkeiten hätten, würde braunes Glas (26,7 %) und Blister in einer Pappschachtel (26,6 %), gefolgt von blauem Glas (23,2 %) ausgewählt. Eine Plastikdose würde mit 8,6 % deutlich seltener ausgewählt (siehe Abbildung 47). Dieses Ergebnis kann die Präferenz für blaues Glas als Verpackung, wie sie aus dem CBC-Experiment hervorging, nicht bestätigen. Ein klarer Verpackungsfavorit lässt sich aus diesem Ergebnis nicht ausmachen.

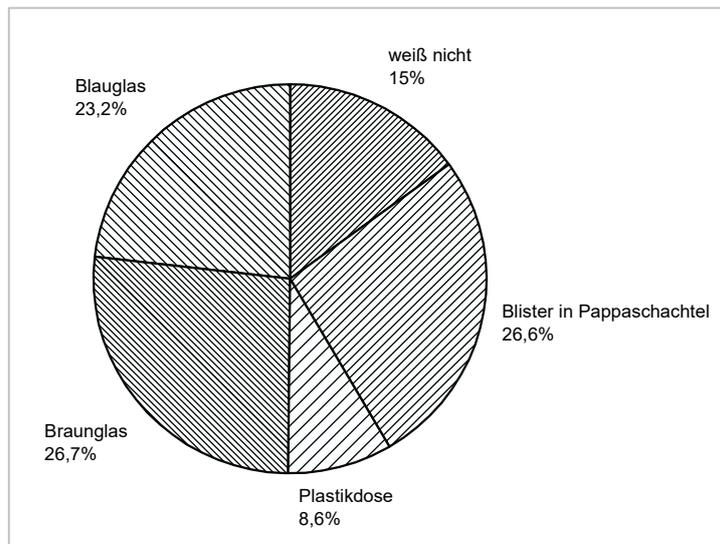


Abbildung 47. Bevorzugte Verpackungsart (n=1819).

Als gewünschten Erwerbort gaben mehr als zwei Drittel der Teilnehmenden (69,0 %) die Apotheke an, gefolgt von der Drogerie mit 56,6 % (siehe Abbildung 48). Ein Erwerb über das Internet wäre für 36,8 % vorstellbar. Das Ergebnis bestätigt die Erkenntnisse aus der CBC-Studie. Apotheken wären für das untersuchte NHP damit als Vertriebsort anzustreben, gefolgt von einer möglichen Vermarktung über Drogeriemärkte. Apotheken sind auch für andere freiverkäufliche Gesundheitsprodukte beliebte Erwerbsstätten, die unter anderen wegen guter fachlicher Beratung geschätzt werden (Bialy und Emmerton 2007; Chan und Tran 2016; Emmerton 2008).

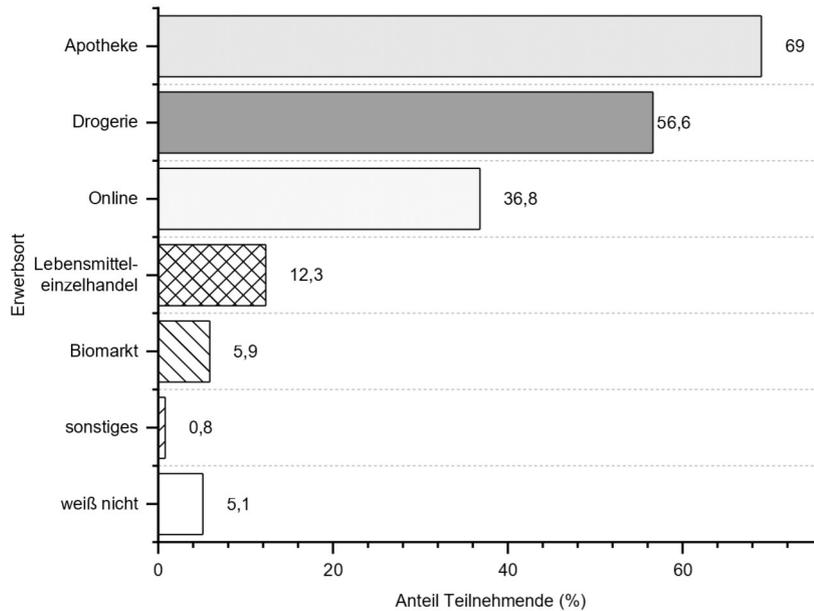


Abbildung 48. Orte, an denen Konsumenten das Produkt erwerben wollen würden (n=1819), Mehrfachnennung möglich.

Auf die Frage, inwiefern sich die Teilnehmenden vorstellen können, das vorgestellte Produkt einzunehmen, gaben 43,8 % an, eine mittel- bis kurzfristige präventive Einnahme in Erwägung ziehen zu können. Über ein Drittel gab zudem an, sich eine langfristig präventive Einnahme (36,0 %) und/oder eine akute Einnahme im Bedarfsfall (35,9 %) vorstellen zu können (siehe Abbildung 49). Das Interesse an komplementären und alternativen Gesundheitsprodukten spielt insbesondere auch bei der Prävention sowie der Behandlung von kognitiven Einschränkungen im Alter eine Rolle (Lavretsky 2009).

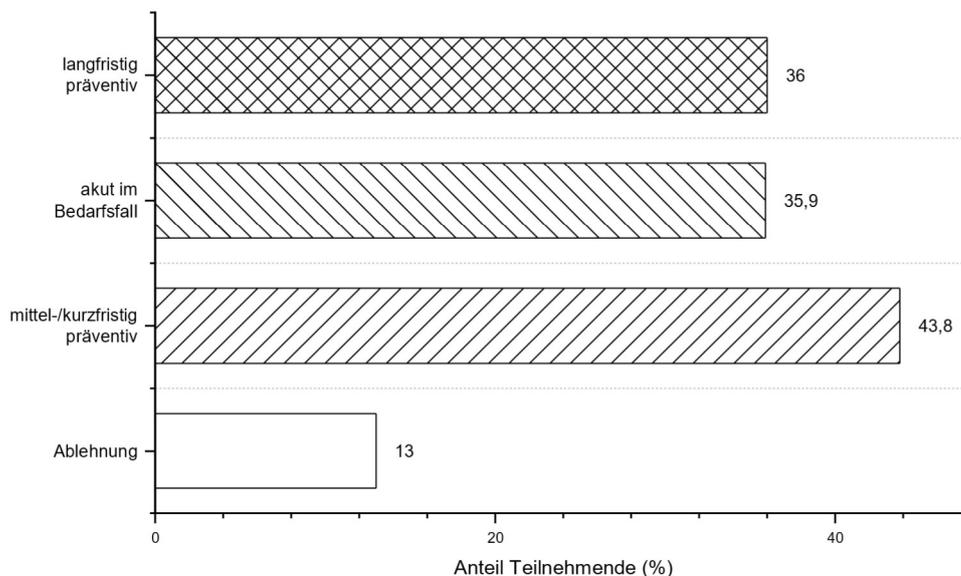


Abbildung 49. Antworten auf die Frage: Können Sie sich vorstellen, ein solches Produkt einzunehmen? (n=1819), Mehrfachnennung möglich.

Welche weiteren Informationen sich die Teilnehmenden zu dem Produkt wünschen, ist in Abbildung 50 dargestellt. Mehr als drei Viertel der Befragten wünschen sich weitere Informationen zur Wirksamkeit und Wirkungsweise (86,3 %) und zur Sicherheit des Produktes und dessen Inhaltsstoffen (76,3 %). Informationen zur Herkunft und Verarbeitung der verwendeten Pflanzen sind von 65,4 % der Teilnehmenden gewünscht, gefolgt von Informationen zum Hersteller (49,0 %). Erfahrungsberichte von anderen Verwendern des Produkts wünschen sich 44,4 %. Informationen zur Nachhaltigkeit des Produkts werden mit 34,4 % am wenigsten nachgefragt.

Die Art der gewünschten Informationen passt mit den Erkenntnissen aus dem Attributranking zusammen. Für (potentielle) Konsumenten scheinen demnach das Vorhandensein sowie eine entsprechende Information zu Wirkung und Produktsicherheit eines NHP wichtiger, als beispielsweise zu Nachhaltigkeitsaspekten. Wissenschaftlich fundierte Informationen für (potentielle) Verwender, z. B. zur korrekten Anwendung sowie zu möglichen Neben- und Wechselwirkungen etc., sind auch für pflanzliche Gesundheitsprodukte in anderen Anwendungsfeldern wichtig (Wachtel-Galor und Benzie 2011).

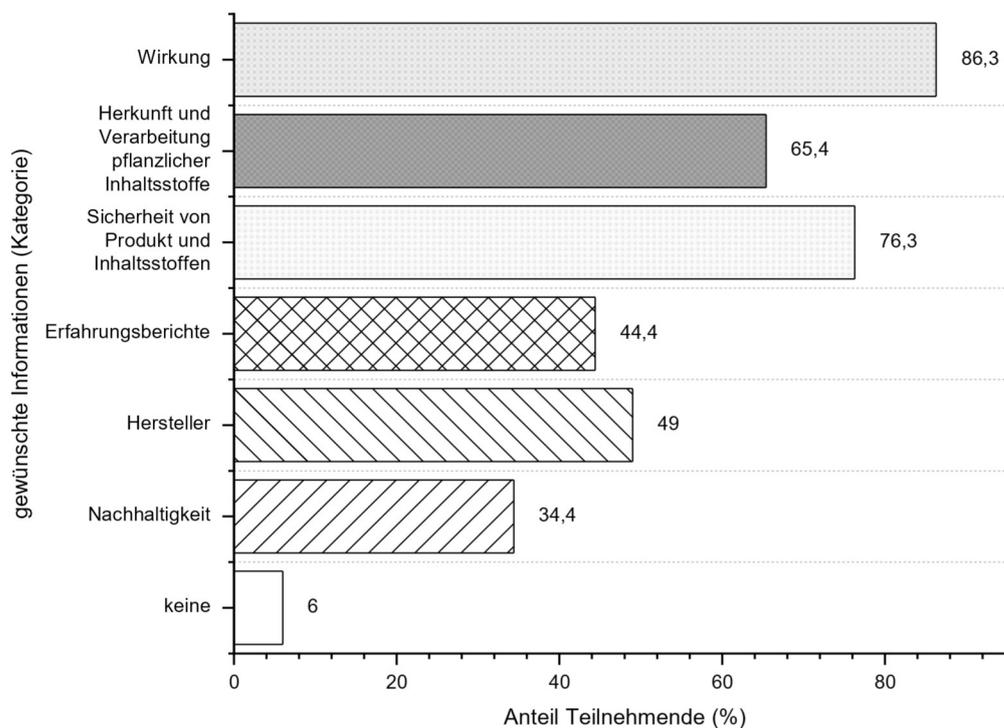


Abbildung 50. Von Teilnehmenden gewünschte weitere Informationen zu dem Produkt (n=1819); Mehrfachnennung möglich.

5 Fazit und Ausblick

Im Rahmen des Projektes gelang eine Anreicherung der neuroregenerativen Substanzgruppe durch das untersuchte katalytische Umwandlungsverfahren mittels Ameisensäure, aber auch Essigsäure. Während Essigsäure den Vorteil der Lebensmittelzulassung in Deutschland hat, führt der Einsatz von Ameisensäure zur Umwandlung in Xanthohumol A. Das Cyclodextrin-unterstützte Anreicherungsverfahren lieferte in den HP- β -Cyclodextrin-Fractionen stark an Xanthohumol A angereicherte Extrakte. Diese zeigten Differenzierungsinduktion mit einem Trend zur Korrelation mit den Gehalten an Xanthohumol A. Die Differenzierungsaktivität ist geringer als jene der im Assay verwendeten Positivkontrolle, allerdings signifikant unterschiedlich zu unbehandelten Zellen. Des Weiteren zeigten die Extrakte eine neuroprotektive Wirkung bezüglich der NO induzierten oxidativen Schädigung. Die moderate Wirkung der Extrakte kann vor allem bei präventiver, langfristiger Verwendung, wie sie bei Phytopharmaka angestrebt ist, vorteilhaft sein. Zusätzlich kann sich hier ein Akkumulationseffekt ergeben. Die meisten potentiellen Verwender können sich eine kurz- bis mittelfristig präventive Einnahme eines NHPCC mit Hopfen vorstellen. Eine Hervorhebung des Akkumulationseffekts der Wirkung bei längerfristig präventiver Einnahme in entsprechenden Produktmarketingaktionen könnte die Bereitschaft über kurz- und mittelfristige Prävention hinaus erweitern.

Auch wenn die Hopfenreinsubstanzen und Extrakte nur eine moderate Neurogeneseaktivität zeigten, so konnten mit den prenylierten Flavanonen Substanzen des Hopfens identifiziert werden, die ein großes neuroprotektives Potential bergen. Dass eine Verlängerung der Prenylseitenkette einen positiven Effekt auf die anti-oxidative Wirkung von Molekülen bewirkt, konnte auch schon an anderen Substanzen wie beispielsweise dem Apigenin gezeigt werden (Wätjen et al. 2007). Da oxidativer Stress ein früher Auslöser einer Großzahl an Krankheiten unter anderem auch neurodegenerativer Erkrankungen ist, ist die weitere Forschung an den Flavonoiden des Hopfens für die Verwendung als NHP vielversprechend.

Neben den Untersuchungen zur Gewinnung und Aktivität von neuroprotektiven Substanzen aus Hopfen wurde auch die Verbraucherakzeptanz eines potenziellen neuen Produktes auf dieser Basis eruiert. Dabei zeigte sich, dass ein NHPCC mit einem neuartigen Hopfenextrakt für viele potentielle Konsumenten als pflanzliches Arzneimittel attraktiver wäre im Vergleich zu einem Nahrungsergänzungsmittel. Allerdings hätte es zugelassen als Nahrungsergänzungsmittel den Vorteil, dass ein Zusatz von B-Vitaminen, wie von vielen Studienteilnehmern gewünscht, möglich wäre. Hinsichtlich der Vermarktung könnte das Produkt als Nahrungsergänzungsmittel mit Bezug auf die Vitamine den Health Claim „Zur Unterstützung der Gedächtnis- und Konzentrationsleistung“ tragen. Da die mittlere Wichtigkeit der Zulassungsform verhältnismäßig gering ist, könnte die Zulassungsform aber auch zu einem späteren Zeitpunkt, wenn mehr Erkenntnisse zur technischen Umsetzbarkeit des Produktes, auch hinsichtlich konkreter Inhaltsstoffe, deren Wirksamkeit und entsprechend notwendigen Prüf- und Sicherheitsverfahren, vorliegen, festgelegt werden.

Der anti-oxidative Effekt des Hopfenextrakts wurde im Rahmen dieses Projektes durch *in vitro* Diagnostik ermittelt und gibt deshalb nur einen ersten Anhaltspunkt über eine mögliche Wirkung. Ob sich der Effekt im lebenden Organismus reproduzieren lässt, wäre deshalb im Zuge von klinischen Studien der nächste Schritt in der Evaluierung für den Einsatz von Hopfenflavonoiden in NHPCC.

Da die getesteten anti-oxidativen Flavanone mit verlängerten Prenylseitenketten eine immer größere Zytotoxizität zeigten, müsste auch im Zuge der Evaluierung der Unbedenklichkeit dieser Substanzen weitere Experimente durchgeführt werden.

Preislich sollte sich das neu entwickelte Produkt im Segment unter 10 € befinden. Als Erwerbort bevorzugen die meisten Verbraucher Apotheken, gefolgt von Drogerien. Diese wären zum Vertrieb

entsprechend anzustreben. Weitere Untersuchungen können angestellt werden, um das Produktkonzept hinsichtlich weiterer Produktattribute zu spezifizieren bzw. zu optimieren.

Als Zielgruppe kommen Menschen in Frage, die Erfahrung mit der Verwendung von NHP haben bzw. solche, die einer zukünftigen Verwendung offen gegenüberstehen. Zwei mögliche Zielgruppen sehen einen positiven Nutzen in einem NHPCC mit Hopfenextrakten in Dragee-Form. Die kleinere der beiden Gruppen würde die Dragees in Blister in einer Pappschachtel verpackt bevorzugen. Die größere Zielgruppe mit einem positiven Nutzenwert für das Produkt würde hingegen eine Glasverpackung, bevorzugt in blauer Farbe, präferieren. Die bevorzugten Attributausprägungen dieser Gruppe stimmen in fast allen abgefragten Attributen mit denen der Gesamtstichprobe überein. Der einzige Unterschied ist eine höhere Preisbereitschaft, d. h. die Personen in der Zielgruppe würden einen größeren Nutzen in dem Produkt sehen, wenn es im mittleren statt im niedrigen Preissegment vermarktet würde. Über 40% der Menschen in dieser Gruppe sind unter 40 Jahre alt. Sie beinhaltet mehr Frauen als Männer. Mehr als die Hälfte lebt dabei eher in einem städtischen Umfeld und hat ein durchschnittliches monatliches Haushaltsnettoeinkommen zwischen 1000 und 3000 € zur Verfügung.

Verbrauchern sollten die Ergebnisse zu Studien der Wirkung und Unbedenklichkeit eines NHPCC mit Hopfenflavonoiden wissenschaftspropädeutisch nahegebracht werden. Informations- und Marketing-Kampagnen würden notwendig, um bei Verbrauchern eine Assoziation von Hopfen zu Gedächtnis- und Konzentrationsleistung herzustellen und somit deren Aufmerksamkeit und Interesse für das Gesundheitsprodukt zu gewinnen sowie um weitere Informationen u. a. zur Wirksamkeit und Sicherheit des Produktes zu kommunizieren.

6 Handlungsempfehlungen für die Politik

Um die Erkenntnisse aus dem Forschungsvorhaben gewinnbringend für die Landwirtschaft, die Wirtschaft, Gesellschaft und die Menschen in Bayern umsetzen zu können, sind neben Aktivitäten aus verarbeitenden Unternehmen und Handel auch Initiativen und Maßnahmen von Seiten der Politik wünschenswert. Diese betreffen verschiedene Bereiche politischen Handelns und sollen im Folgenden näher erläutert werden.

Zunächst gestaltet die Politik entscheidend die Rahmenbedingungen für Forschung und Innovationen bei pflanzenbasierten Produkten und Pharmazeutika. In diesem Forschungsvorhaben (und auch aus vielen anderen Forschungsprojekten) wurden pflanzliche Inhaltsstoffe identifiziert und für eine potenzielle pharmazeutische Nutzung weiterentwickelt. Die ersten Schritte in Richtung Wirksamkeits- und Sicherheitsprüfung oder Test auf mögliche Nebenwirkungen können meistens noch im Rahmen von öffentlich geförderten Forschungsprojekten erbracht werden (wie dies auch im Falle des Hopfens mit Ziel einer neuroprotektiven Wirkung erfolgt ist). Falls die identifizierten Wirkstoffe dabei erfolgreich sind, wären weitere Schritte in Richtung Sicherheitsforschung und Wirksamkeitsüberprüfung erforderlich (z. B. hier verstärkte Einbindung von Verhaltens-/Memory Tests im Tierversuch). Es ist lange bekannt, dass die universitäre Stofffindung und erste Prüfungen potenziell interessanter pflanzlicher Wirkstoffe noch nicht das Interesse von Pharmaunternehmen oder anderen Unternehmen in der klinischen Arzneimittelforschung finden. Diese Lücke in der Erprobung und Entwicklung von potenziell klinisch interessanten pflanzlichen Wirkstoffen könnte durch staatliche Förderprogramme überbrückt werden, in die auch private Akteure mit substanziellen Anteilen eingebunden werden können. Ziel sollte dabei sein, die Schritte in der pharmazeutischen Forschung und Erprobung auch von Naturstoffen soweit voranzubringen, dass diese auch für wirtschaftliche Akteure interessant werden. Dazu sind zumeist Gebrauchsmuster notwendig, die im Rahmen solcher Projekte erstellt werden können.

Generell ist ein Großteil der Fördermaßnahmen für pharmazeutische Forschung auf chemisch-synthetische Wirkstoffe ausgerichtet. Pharmazeutisch interessante Naturstoffe werden dabei oftmals vernachlässigt oder nur randständig berücksichtigt. Dies gilt z. B. für viele Pflanzen und Kräuter, die in Bayern wachsen oder angebaut werden könnten, wo oberflächlich einiges bekannt ist, aber viele bislang noch kaum weiter im Hinblick auf pharmazeutisch interessante Wirkstoffe untersucht wurden. Dies reduziert nicht nur generell die Innovationsmöglichkeiten in diesem Bereich, sondern vermindert auch das Chancenpotenzial, das gerade in Bayern in diesem Feld vorhanden ist. Neben einer erfolgreichen Forschung in öffentlichen Einrichtungen werden in Bayern noch relativ viele pharmazeutisch interessante Pflanzen angebaut, und auch die Unternehmen zur Aufbereitung und Weiterverarbeitung dieser Pflanzen sind in Bayern zumindest teilweise vorhanden. Allerdings sind die verschiedenen Akteure lokal zersplittert und es gibt bislang auch kaum funktionierende Netzwerke in diesem Bereich. Daher sollte das vorhandene Know-how der interessierten Akteure gebündelt werden mit dem Ziel, Forschung und Innovation in diesem zukunftssträchtigen Feld zu intensivieren. Vorbild dafür könnte das Phyto-Valley Projekt in der Region Innsbruck/Österreich sein, bei dem diese Zielsetzung bereits angegangen und umgesetzt wird.

Auch bei der Rohstoffgewinnung und der Produktion von (pflanzlichen) Arzneimitteln gibt es Verbesserungspotenzial. Zwar werden noch relativ viele Arznei- und Heilpflanzen in Bayern angebaut, allerdings mangelt es an Züchtungsmaßnahmen für die meisten dieser Pflanzen. Dies gilt auch für den in diesem Forschungsprojekt besonders untersuchten Hopfen. Falls es bei dieser Pflanze Züchtungsmaßnahmen gibt, sind diese auf seine Nutzung zum Bierbrauen ausgerichtet. Dabei wäre die Züchtung spezifischer Hopfensorten, die höhere Anteile von pharmazeutisch interessanten Stoffen bzw. den neuroregenerativ wirksamen Flavonoiden enthalten, eine wesentliche Maßnahme, um die Rohstoffseite für diese interessanten Pflanzenwirkstoffe deutlich zu verbessern. Auch in diesem Feld könnte die Politik aktiv werden, um gemeinsam mit der Wirtschaft entsprechende

Züchtungsmaßnahmen für Spezialkulturen (v.a. auch mit pharmazeutischer Wirksamkeit) ins Leben zu rufen.

Aber auch für die Produktion von weiteren pflanzlichen Arzneimitteln besteht Handlungsbedarf, da nicht alleine die Corona-Pandemie gezeigt hat, dass Bayern und Deutschland in diesem Bereich in sehr hohem Maße vom Ausland abhängig sind. Hier sollten in Zukunft verstärkte Anstrengungen unternommen werden, wieder mehr Produktionskapazitäten in Deutschland und Europa aufzubauen. Die Nutzung der Abwärme aus Biogas- oder Industrieanlagen lässt auch die Weiterverarbeitung von Pflanzen auch aus tropischen Regionen zu. Gerade im Zuge der Bündelung der Kompetenzen zu in Bayern heimischen pharmazeutisch wirksamen Pflanzen ist die Produktionsseite für daraus gewonnene Pharmazeutika ein wichtiger Teil, der auch in Bayern umgesetzt werden sollte.

Die Studie hat gezeigt, dass die Verbraucherinnen und Verbraucher oft wenig über pflanzliche Arzneimittel und die zugrundeliegenden Rohstoffpflanzen wissen, obwohl sie generell ein großes Interesse an diesen Produkten zeigen. Hier zeigt sich eine Kluft, die sich in den letzten 50 Jahren entwickelt hat mit dem abnehmenden Kontakt vieler Teile der Bevölkerung zu Pflanzen in ihrer Umgebung, aber gleichzeitig einem Interesse an „natürlichen Lösungen“ auch bei der Prävention und Therapie von Krankheiten. Um den Absatz entsprechender vorhandener und neu zu entwickelnder Produkte in dem Feld zu unterstützen, sind vielseitige und auf verschiedenartige Zielgruppen zugeschnittene Informations- und Kommunikationsangebote notwendig. Neben wirtschaftlichen und privaten Akteuren ist es eine staatliche Aufgabe, v.a. im Bereich der schulischen, beruflichen und Hochschulausbildung für die entsprechenden Angebote zu sorgen, um das Feld nicht zu sehr wenig qualifizierten Angeboten des Internets mit zweifelhaftem wissenschaftlichem Hintergrund zu überlassen. Dazu könnten z. B. modularisierte (Weiter-)Bildungsangebote zu pflanzlichen Pharmazeutika in wichtigen Indikationsfeldern, deren Zusammensetzung und ihren Vorteilen beitragen. Weiterhin kann z. B. in Form von Thementagen an Schulen, Informationsangeboten für Erwachsene oder digitalen Informationsaktivitäten das Interesse für solche Produkte gesteigert werden

Aber nicht nur in der Bevölkerung, sondern auch bei medizinischem Fachpersonal bestehen Wissens- und Erfahrungslücken zu pflanzlichen Arzneimitteln insbesondere in neueren Anwendungsfeldern, wozu die neuroprotektiven Wirkungen von Hopfeninhaltsstoffen gehören. Daher ist anzustreben, die Fortbildung für Ärztinnen und Ärzte und anderem medizinischen Fachpersonal in diesem Feld zu verbessern. Auch in der Ausbildung sollte diesen Themen ein stärkeres Gewicht gegeben werden. Damit werden die Voraussetzungen für eine stärkere Akzeptanz zur Nutzung von pflanzlichen Arzneimitteln in der Prävention und Behandlung von Krankheiten gelegt, die auch positive Auswirkungen auf die Selbstmedikation der Patientinnen und Patienten haben dürfte. Alle die vorgeschlagenen Informations-, Kommunikations- und Ausbildungsmaßnahmen lassen sich hervorragend als begleitende Maßnahmen in die vorgeschlagene Bündelung des Know-hows der Akteure in diesem Feld integrieren. Wir als Hochschule für angewandte Wissenschaften sehen dies durchaus als Aufgabe (auch im Zuge des neuen Hochschulgesetzes für Bayern), können dies jedoch aufgrund des weitgehend fehlenden akademischen Mittelbaus derzeit nicht leisten.

Zusammenfassend hat dieses Projekt gezeigt, dass aus altbekannten Heilpflanzen wie dem Hopfen neue Wirkungen mit sehr interessanten Zukunftsperspektiven gefunden und weiterentwickelt werden können. Die Politik sollte nicht nur die Rahmenbedingungen für eine innovative Umsetzung dieser Erkenntnisse in Bayern verbessern, sondern auch mutig neue Wege und Strategien einschlagen, um ähnliche Entwicklungen bei anderen medizinisch interessanten Pflanzen, die in Bayern heimisch sind, zu unterstützen.

7 Literaturverzeichnis

- Aigner, Ludwig; Oberbauer-Hofmann, Eleni; Couillard-Despres, Sébastien; Rivera, Francisco Javier; Riepl, Herbert; Urmann, Corinna; Biendl, Martin (2012): Chromane-like cyclic prenylflavonoids for the medical intervention in neurological disorders am 15.06.2012. Anmelden: PCT/EP2012/061524. Veröffentlichungsnr: WO 2012172090 A1 20121220.
- Allenby, Greg; Fennell, Geraldine; Huber, Joel; Eagle, Thomas; Gilbride, Tim; Horsky, Dan et al. (2005): Adjusting choice models to better predict market behavior. In: *Marketing Letters* 16 (3), S. 197–208.
- Al-Windi, Ahmad (2004): Predictors of herbal medicine use in a Swedish health practice. In: *Pharmacoepidemiology and Drug Safety* 13 (7), S. 489–496. DOI: 10.1002/pds.901.
- Amm, Antonius (2021): Wissen über Heilpflanzen bei Konsum von pflanzlichen Arzneimitteln: Eine Konsumentensegmentierung und Analyse sozio-demographischer Unterschiede der Segmente. Bachelorarbeit. Technische Universität München, München.
- aponet.de (2020): Wirksame pflanzliche Arzneimittel nur in der Apotheke. Online verfügbar unter <https://www.aponet.de/artikel/wirksame-pflanzliche-arzneimittel-nur-in-der-apotheke-21870>, zuletzt geprüft am 28.11.2021.
- Aschenbrenner, Ludwig (2018): Hopfen (*humulus lupulus* L.) als Heilmittel: Konsumentenakzeptanz der Arzneipflanze, neue Wirkungspotenziale und Präferenzen bei der pharmazeutischen Produktgestaltung. Masterthesis. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf, Straubing.
- B.A.H., Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller (2022): Der Arzneimittelmarkt in Deutschland. Zahlen & Fakten aus 2021. Online verfügbar unter <https://www.yumpu.com/de/document/read/66878220/bah-zahlenbroschure-2021>, zuletzt geprüft am 19.12.2022.
- Bazan, Nicolas G.; Musto, Alberto E.; Knott, Eric J. (2011): Endogenous signaling by omega-3 docosahexaenoic acid-derived mediators sustains homeostatic synaptic and circuitry integrity. In: *Molecular neurobiology* 44 (2), S. 216–222. DOI: 10.1007/s12035-011-8200-6.
- Bialy, Leisa H.; Emmerton, Lynne M. (2007): Trans-Tasman Comparison of Non-Prescription Medicine Purchasing Behaviour. In: *Journal of Pharmacy Practice and Research* 37 (4), S. 277–280.
- BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie (2021): Pharma-Daten 2021. Online verfügbar unter https://www.bpi.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Publikationen/Pharma-Daten/Pharma-Daten_2021_DE.pdf, zuletzt geprüft am 26.01.2022.
- BPI, Bundesverband der pharmazeutischen Industrie (2022): OTC-Daten 2022. Online verfügbar unter https://www.bpi.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Publikationen/OTC-Daten/OTC-Daten_2022.pdf, zuletzt geprüft am 19.12.2022.
- Chan, Vincent; Tran, Hung (2016): Purchasing Over-the-counter medicines from Australian pharmacy: What do the pharmacy customers value and expect? In: *Pharmacy Practice (Granada)* 14 (3).
- Diller, Reinhard A.; Riepl, Herbert M.; Rose, Oliver; Frias, Corazon; Henze, Günter; Prokop, Aram (2007): Ability of prenylflavanones present in hops to induce apoptosis in a human Burkitt lymphoma cell line. In: *Planta medica* 73 (8), S. 755–761. DOI: 10.1055/s-2007-981545.
- Dresing, T.; Pehl, T. (2015): Praxisbuch Interview, Transkription & Analyse Anleitungen und Regelsysteme für qualitativ Forschende. Manual for interview, transcription, analysis, rules for qualitative researcher. Marburg: dr dresing & pehl GmbH (16).

- Drumond, Nélio (2020): Future perspectives for patient-centric pharmaceutical drug product design with regard to solid oral dosage forms. In: *Journal of pharmaceutical innovation* 15 (3), S. 318–324.
- Drumond, Nélio; van Riet-Nales, Diana A.; Karapinar-Çarkit, Fatma; Stegemann, Sven (2017): Patients' appropriateness, acceptability, usability and preferences for pharmaceutical preparations: Results from a literature review on clinical evidence. In: *International journal of pharmaceutics* 521 (1-2), S. 294–305.
- Dyer, B. W.; Ferrer, F. A.; Klinedinst, D. K.; Rodriguez, R. (2000): A noncommercial dual luciferase enzyme assay system for reporter gene analysis. In: *Analytical biochemistry* 282 (1), S. 158–161. DOI: 10.1006/abio.2000.4605.
- Emmerton, Lynne (2008): Behavioural aspects surrounding medicine purchases from pharmacies in Australia. In: *Pharmacy Practice* 6 (3), S. 158–164.
- Europäisches Parlament und Europäischer Rat (2005): Richtlinie 2001/83/EG des Europäischen Parlaments und des Rates vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodexes für Humanarzneimittel, vom 06.11.2001. Online verfügbar unter https://www.pei.de/SharedDocs/Downloads/DE/service/rechtliches/richtlinie-2001-83-eg-gemeinschaftskodex-humanarzneimittel-2001-11-06.pdf?__blob=publicationFile&v=2, zuletzt geprüft am 19.12.2022.
- Gardiner, Paula; Graham, Robert; Legedza, Anna T. R.; Ahn, Andrew C.; Eisenberg, David M.; Phillips, Russell S. (2007): Factors associated with herbal therapy use by adults in the United States. In: *Alternative Therapies in Health and Medicine* 13 (2), S. 22–29.
- Gravanis, Achille G.; Mellon, Synthia H. (2011): Hormones in neurodegeneration, neuroprotection, and neurogenesis: John Wiley & Sons.
- Greenberg, Saul; Carpendale, Sheelagh; Marquardt, Nicolai; Buxton, Bill (2012): The narrative storyboard: telling a story about use and context over time. In: *interactions* 19 (1), S. 64–69.
- Kempermann, Gerd (2006): Adult neurogenesis: stem cells and neuronal development in the adult brain: Oxford University Press, USA.
- Kemppainen, Laura M.; Kemppainen, Teemu T.; Reippainen, Jutta A.; Salmenniemi, Suvi T.; Vuolanto, Pia H. (2018): Use of complementary and alternative medicine in Europe: Health-related and sociodemographic determinants. In: *Scandinavian journal of public health* 46 (4), S. 448–455. DOI: 10.1177/1403494817733869.
- Kennedy, Jae (2005): Herb and supplement use in the US adult population. In: *Clinical Therapeutics* 27 (11), S. 1847–1858. DOI: 10.1016/j.clinthera.2005.11.004.
- Kooperation Phytopharmaka (2015): Pflanzliche Arzneimittel | Nahrungsergänzungsmittel mit pflanzlichen Inhaltsstoffen: Ähnlich aber nicht gleich. Was Sie beim Kauf beachten sollten! Online verfügbar unter <https://www.koop-phyto.org/wp-content/uploads/2021/06/koop-broschuere-nahrungsergaenzungsmittel.pdf>, zuletzt geprüft am 28.10.2022.
- Lavretsky, Helen (2009): Complementary and alternative medicine use for treatment and prevention of late-life mood and cognitive disorders. In: *Aging health* 5 (1), S. 61–78. DOI: 10.2217/1745509X.5.1.61.
- Lee, Hak Ju; Da Lyu, Hyun; Koo, Uk; Nam, Kung-Woo; Hong, Seong Su; Kim, Kem Ok et al. (2012): Protection of prenylated flavonoids from Mori Cortex Radicis (Moraceae) against nitric oxide-induced cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. In: *Archives of pharmacal research* 35 (1), S. 163–170. DOI: 10.1007/s12272-012-0118-7.

- Lee, Seungjoo; Kim, Dong Hyun; Lee, Dong Hwa; Jeon, Su Jin; Lee, Chang Hwan; Son, Kun Ho et al. (2010): Oroxylin A, a flavonoid, stimulates adult neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus region of mice. In: *Neurochemical research* 35 (11), S. 1725–1732. DOI: 10.1007/s11064-010-0235-y.
- Li, Ming; Tsang, Kam-Sze; Choi, Sze-Ting; Li, Karen; Shaw, Pang-Chui; Lau, Kwok-Fai (2011): Neuronal differentiation of C17.2 neural stem cells induced by a natural flavonoid, baicalin. In: *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 12 (3), S. 449–456. DOI: 10.1002/cbic.201000570.
- Lim, Jung Su; Yoo, Minjoo; Kwon, Hyun Jung; Kim, Hyosup; Kwon, Yunhee Kim (2010): Wogonin induces differentiation and neurite outgrowth of neural precursor cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 402 (1), S. 42–47. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.09.098.
- Liu, Rui Ting; Zou, Li Bo; Fu, Jie Ying; Lu, Qiu Jun (2010): Promotion of rat brain-derived progenitor cell neurogenesis by liquiritigenin treatment: underlying mechanisms. In: *Neuroscience letters* 481 (3), S. 139–143. DOI: 10.1016/j.neulet.2010.06.065.
- Mennella, Julie A.; Spector, Alan C.; Reed, Danielle R.; Coldwell, Susan E. (2013): The Bad Taste of Medicines: Overview of Basic Research on Bitter Taste. In: *Clinical Therapeutics* 35 (8), S. 1225–1246. DOI: 10.1016/j.clinthera.2013.06.007.
- Miranda, C. L.; Stevens, J. F.; Helmrich, A.; Henderson, M. C.; Rodriguez, R. J.; Yang, Y. H. et al. (1999): Antiproliferative and cytotoxic effects of prenylated flavonoids from hops (*Humulus lupulus*) in human cancer cell lines. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 37 (4), S. 271–285. DOI: 10.1016/s0278-6915(99)00019-8.
- Oberbauer, Eleni; Urmann, Corinna; Steffenhagen, Carolin; Bieler, Lara; Brunner, Doris; Furtner, Tanja et al. (2013): Chroman-like cyclic prenylflavonoids promote neuronal differentiation and neurite outgrowth and are neuroprotective. In: *The Journal of nutritional biochemistry* 24 (11), S. 1953–1962. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.005.
- Peers, Chris; Dallas, Mark L.; Boycott, Hannah E.; Scragg, Jason L.; Pearson, Hugh A.; Boyle, John P. (2009): Hypoxia and neurodegeneration. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1177, S. 169–177. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2009.05026.x.
- Rashrash, Mohamed; Schommer, Jon C.; Brown, Lawrence M. (2017): Prevalence and Predictors of Herbal Medicine Use Among Adults in the United States. In: *Journal of Patient Experience* 4 (3), S. 108–113. DOI: 10.1177/2374373517706612.
- Reynolds, Thomas; Gutman, Jonathan (1988): Laddering Theory, Method, Analysis and Interpretation. In: *Journal of Advertising Research*. Online verfügbar unter <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.556.7640&rep=rep1&type=pdf>, zuletzt geprüft am 19.06.2020.
- Reynolds, Thomas J.; Olson, Jerry C. (2001): Understanding consumer decision making: The means-end approach to marketing and advertising strategy: Psychology Press.
- Riepl, Herbert; Urmann, Corinna (2012): Refining process for separation of prenylated polyphenols am 2012. Veröffentlichungsnr: DE201210105613.
- Riepl, Herbert; Urmann, Corinna; Kirchinger, Michael; Burger, Tobias; Menrad, Klaus; Welz, Alexandra (2018): Extraktionsverfahren bioaktiver Naturstoffe aus Hopfen. (ExBiNah). Abschlussbericht. Hochschule Weihenstephan-Triesdorf. Straubing.

- Riss, Terry L.; Moravec, Richard A.; Niles, Andrew L.; Duellman, Sarah; Benink, Hélène A.; Worzella, Tracy J.; Minor, Lisa (2004): Assay Guidance Manual. Cell Viability Assays. Hg. v. Sarine Markossian, Abigail Grossman, Kyle Brimacombe, Michelle Arkin, Douglas Auld, Chris Austin, et al. Bethesda (MD).
- Roullet, Bernard; Droulers, Olivier (2005): Pharmaceutical packaging color and drug expectancy. In: *ACR North American Advances* 32, S. 164–171.
- Sagara, Yutaka; Vanhnasy, Julie; Maher, Pamela (2004): Induction of PC12 cell differentiation by flavonoids is dependent upon extracellular signal-regulated kinase activation. In: *Journal of neurochemistry* 90 (5), S. 1144–1155. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2004.02563.x.
- Sahay, Amar; Hen, Rene (2007): Adult hippocampal neurogenesis in depression. In: *Nature neuroscience* 10 (9), S. 1110–1115.
- Santos, Clementina M. M.; Silva, Artur M. S. (2020): The Antioxidant Activity of Prenylflavonoids. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (3). DOI: 10.3390/molecules25030696.
- Sawtooth Software (2013): Lighthouse Studio. HB-Reg. USA: Sawtooth Software. Online verfügbar unter <https://content.sawtoothsoftware.com/assets/7ed14c72-c04c-4333-9081-53b8f35d52a1>, zuletzt geprüft am 22.11.2022.
- Sawtooth Software (2021): The Latent Class Technical Paper. Version 4.8. TECHNICAL PAPER SERIES. Utah.
- Sawtooth Software (2022): Lighthouse Studio. Choice-Based Conjoint (CBC) Analysis. USA: Sawtooth Software. Online verfügbar unter <https://sawtoothsoftware.com/conjoint-analysis/cbc>, zuletzt geprüft am 22.11.2022.
- Sebaugh, J. L. (2011): Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. In: *Pharmaceutical statistics* 10 (2), S. 128–134. DOI: 10.1002/pst.426.
- Serifi, Arianit (2017): Analyse kaufrelevanter produktspezifischer Eigenschaften und Verbraucherpr  ferenzen bei pflanzlichen Medikamenten. Masterthesis. Technische Universität München, Straubing.
- Sirois, Fuschia M. (2008): Motivations for consulting complementary and alternative medicine practitioners: A comparison of consumers from 1997-8 and 2005. In: *BMC complementary and alternative medicine* 8, Artikel 16. DOI: 10.1186/1472-6882-8-16.
- Sirois, Fuschia M.; Gick, Mary L. (2002): An investigation of the health beliefs and motivations of complementary medicine clients. In: *Social Science & Medicine* 55 (6), S. 1025–1037. DOI: 10.1016/s0277-9536(01)00229-5.
- Stegemann, Sven; Ternik, Robert L.; Onder, Graziano; Khan, Mansoor A.; van Riet-Nales, Diana A. (2016): Defining patient centric pharmaceutical drug product design. In: *The AAPS journal* 18 (5), S. 1047–1055.
- Stenger, Christophe; Naves, Thomas; Verdier, Mireille; Ratinaud, Marie-Helene (2011): The cell death response to the ROS inducer, cobalt chloride, in neuroblastoma cell lines according to p53 status. In: *International journal of oncology* 39 (3), S. 601–609. DOI: 10.3892/ijo.2011.1083.
- Stevens, Jan F.; Ivancic, Monika; Hsu, Victor L.; Deinzer, Max L. (1997): Prenylflavonoids from *Humulus lupulus*. In: *Phytochemistry* 44 (8), S. 1575–1585. DOI: 10.1016/S0031-9422(96)00744-3.