

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|--|---|
| Analysen- und Präzisionswaagen | Sartorius AG, Göttingen |
| Autoklav | Guwina Hofmann, Berlin |
| Brutschränke | Heraeus, Hanau |
| Dermatom Aesculap GA 643 | Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen |
| Drehzahlmesser, RPM-Meter | ELV, Elektronik, Forschungs- und Fertigungs GmbH, Leer |
| Filtrationseinheit Millipore® | Millipore-Waters, Eschborn |
| Franz-Diffusionszellen Modell 4G-01-00-15-12 | PermeGear, Bethlehem, PA, USA |
| HPLC LaChrom®-System | Merck-Hitachi, Darmstadt |
| Autosampler | L-7200 |
| Interface | D-7000 |
| Pumpe | L-7100 |
| UV-Detektor | L-7400 |
| Merck System-Manager-Software | |
| Lamin Air® Sterilarbeitsbank | Heraeus, Hanau |
| Liquid Scintillation Counter 1450 MicoBeta™ Plus | Wallac, Freiburg |
| Magnetrührer Ikamag® RO10 power | Ika Werke GmbH u. Co. KG, Staufen |
| Microplate Reader Multiskan Plus® | Thermo Labsystems, Egelsbach |
| Mikrometer Pocket Thickness Cage | Mitutuyo Meßgeräte GmbH, Neuss |
| pH-Meter 766 Calimatic | Knick, Nürnberg |
| Pipetten Eppendorf Reference® | Eppendorf, Hamburg |

2 Material und Methoden

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Pipettierhilfe Pipetboy® | Integra Biosciences, Fernwald |
| Ultraschallbad Sonorex® RK 100 | Bandelin, Berlin |
| Umwälzthermostat DC10-P5/U | Haake, Karlsruhe |
| Schüttler IKA® MTS 2 | Ika Werke GmbH u. Co. KG, Staufen |
| Vortex-Gerät | Bender & Hobein, Zürich, Schweiz |
| Wasserstrahlpumpe | Brand, Wertheim |
| Zentrifuge Megafuge® 1,0 R | Heraeus, Hanau |

2.1.2 Instrumente und Sonstiges

Anatomische Pinzetten und Scheren

Chirurgische Pinzetten

Haltevorrichtungen

Henkeleisen/Locheisen 20 und 25 mm

Messkolben 5, 10, 25, 50, 100, 200, 250, 500, 2000 mL

Rührstäbe 11 x 2 mm

Skalpelle

Stanze für das EPISKIN®-Modell (separat zum EPISKIN®-Kit erhältlich)

Stanz- und Präparierplatten

Teflon-Adapter für Franzzellen

Thermometer

Verbindungsschläuche für die Wasserbadtemperierung der Franzzellen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|--|------------------------------------|
| Aluminiumfolie | Merck/Eurolab Berlin |
| Biopsie-Stanzen, 8 mm und 4 mm | Stiefel, Offenbach |
| Cellulosemembran Dianorm Typ 10.17, Durchmesser 63 mm | Fa. Günther Maierhofer, München |
| Cryoröhrchen mit Innengewinde, Nunc Cryoline, 1,8 mL | Nunc, Wiesbaden |

2 Material und Methoden

| | |
|---|-------------------------------------|
| Dialysemembran | Kalle AG, Wiesbaden- Biebrich |
| Einmalkanülen (0,8 / 80 mm) | B. Braun, Melsungen AG |
| Einmalpipetten steril (5 mL) | Merck/Eurolab, Berlin |
| Einmalspritzen Braun Omnifix (1mL) | B. Braun, Melsungen AG |
| Eppendorf Reaktionsgefäße, Safe-Lock (1,5 / 2 mL) | Merck/Eurolab, Berlin |
| Filterpapier Typ 595 | Schleicher und Schüll |
| <u>HPLC-Zubehör:</u> | |
| HPLC-Vials mit Mikrolitereinsatz Septen, blauweiß, geschlitzt | CS-Chromatographie Service GmbH |
| Mikrolitereinsatz G30 | CS-Chromatographie Service GmbH |
| <i>Säule:</i> LiChrospher® 100/RP-18 column/12,5 cm x 4mm | VWR International GmbH Darmstadt |
| <i>Vorsäule:</i> Lichrocart 4 – 4 LiChrospher® 100/RP-18 column (5 µm) | VWR International GmbH Darmstadt |
| Parafilm® M | Brand GmbH + Co., Wertheim |
| PE–Gefrierbeutel | handelsüblich |
| Petrischalen | Merck/Eurolab, Berlin |
| Teflonscheibe | Merck/Eurolab, Berlin |
| Watte | handelsüblich |
| 6-Well-, 12-Well- und 96-Well-Platten | Merck/Eurolab, Berlin |

2.1.4 Testsubstanzen, Chemikalien und Lösungen

| | |
|----------------------------|-------------------------------|
| Acetonitril, HPLC grade | Merck, Darmstadt |
| Benzoessäure | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Bovines Serumalbumin (BSA) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Clotrimazol | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |

2 Material und Methoden

| | | |
|---|----------|--|
| [³ H]-Clotrimazol | | Moravek Biochemicals and Radiochemicals, CA, USA |
| Lösungsmittel: EtOH | | |
| Aktivität: 37 MBq/mL | | |
| Digoxin | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| [³ H(G)]-Digoxin | | Perkin Elmer Germany GmbH |
| Lösungsmittel: EtOH | | |
| Aktivität: 37 MBq/mL | | |
| D-Mannitol | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| D-[1- ¹⁴ C]-Mannitol | | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Lösungsmittel: Aqua solution + 2 % EtOH | | |
| Aktivität: 7,4 MBq/mL | | |
| Essigsäure, konz. | | Merck, Darmstadt |
| Ethanol, reinst | | Merck, Darmstadt |
| <u>Fixationsmedium nach Karnovsky, pH 7,5:</u> | | |
| Glutaraldehyd | 2,5 % | Serva, Heidelberg |
| Formaldehyd | 2,0 % | Fluka, Heidelberg |
| in 0,1 M Phosphatpuffer | | |
| Flufenaminsäure | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Igepal [®] CA-630 (Nonidet): | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| [Octylphenoxy]polyethoxyethanol | | |
| Isopropanol, HPLC Grade | | Merck, Darmstadt |
| <u>Isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS):</u> | | |
| <i>Normale Pufferkapazität:</i> | | |
| KCl | 0,2 g | Merck, Darmstadt |
| NaCl | 8,0 g | “ |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g | “ |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 1,44 g | “ |
| oder Na ₂ HPO ₄ | 1,1486 g | “ |
| in Aqua bidest. ad | 1L | |

4fach erhöhte Pufferkapazität:

| | | |
|---|--------|------------------|
| KCl | 0,8 g | Merck, Darmstadt |
| NaCl | 5,5 g | “ |
| KH ₂ PO ₄ | 0,8 g | “ |
| Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O | 8,56 g | “ |
| oder Na ₂ HPO ₄ | 4,53 g | “ |
| in Aqua bidest. ad | 1L | |

pH-Wert-Einstellung auf pH = 7,4 mit NaOH bzw. HCl

Nach Messung des pH-Werts wurden die Pufferlösungen autoklaviert und in verschließbaren Glasflaschen bei 4°C gelagert.

Isotonischer Sörensen-Puffer pH 7,4:

| | | |
|---|--------|------------------|
| KH ₂ PO ₄ | 9,2 g | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 2,0 g | “ |
| NaCl | 4,19 g | “ |
| in Aqua bidest. ad | 1L | |

Nach Ansetzen des Puffers erfolgten Kontrollen des pH-Wertes und eine Lagerung in verschließbaren Glasflaschen bei 4°C.

Ivermectin Sigma-Aldrich,
Deisenhofen

Mcllvaine Puffer pH 2,2 (für HPLC):

| | | |
|---|--------|------------------|
| Citronensäure | 20,8 g | Merck, Darmstadt |
| Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O | 2,0 g | “ |
| in Aqua bidest. ad | 1L | |

Methanol, HPLC Grade, Lichrosolv[®] Merck, Darmstadt

Methylenblau Merck, Darmstadt

Miglyol[®] 812 (mittelkettige Triglyceride) Sigma-Aldrich,
Deisenhofen

MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-
-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) Sigma-Aldrich,
Deisenhofen

MTT-Lösung:

2 mg/mL MTT in PBS

Die Herstellung erfolgte frisch unter Lichtschutz am Versuchstag.

2 Material und Methoden

| | | |
|--|-----------|--|
| Nikotin | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| L-(-)-[N-Methyl- ³ H]-Nikotin | | Perkin Elmer Germany GmbH |
| Lösungsmittel: EtOH | | |
| Aktivität: 37 MBq/mL | | |
| OptiPhase [®] Supermix Cocktail | | Perkin Elmer Germany GmbH |
| <u>Phosphatpuffer (10 mM, pH 2.6):</u> | | |
| NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O | 0,68 g/L | Merck, Darmstadt |
| Phosphorsäure, 85 % | 0,34 mL/L | Merck, Darmstadt |
| Soluene [®] 350 | | Perkin Elmer Germany GmbH |
| Testosteron | | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| [1, 2, 6, 7- ³ H]-Testosteron | | Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg |
| Lösungsmittel: Toluol:EtOH (9:1) | | |
| Aktivität: 37 MBq/mL | | |
| Trichloressigsäure | | Merck, Darmstadt |
| 2.1.5 Rekonstruierte humane Epidermis | | |
| EpiDerm [™] 606-X | | MatTek Corporation, Ashland, MA, USA |
| Durchmesser 22 mm, 4,00 cm ² , age day 14 | | |
| EPISKIN [®] (J13, 1,07 cm ²) | | EPISKIN SNC, Lyon Frankreich |
| Reconstructed Human Epidermis Kit | | |
| SkinEthic [®] Skin Model | | SkinEthic laboratories, Nizza, Frankreich |
| RHE/L/17: Reconstructed Human Epidermis, large, 4,00 cm ² , age day 17 | | |

2.2 Methoden

Im Folgenden werden die Methoden beschrieben, die im Rahmen der Methoden- und Protokollentwicklung in Zusammenarbeit mit den Projektpartnern entwickelt und in den Phasen des Protokolltransfers und Prävalidierung verfeinert wurden. Sie waren Grundlage der abschließenden Untersuchungen in der Validierung.

2.2.1 Durchführung und Qualitätssicherung der Versuche

Testlösungen und Akzeptormedien. Tab. 1 gibt einen Überblick über die physikochemischen Eigenschaften und Konzentrationen der Testsubstanzen sowie über Donor- und Akzeptormedien. Der logD für pH 7,4 diente der präziseren Beschreibung des Verteilungskoeffizienten der dissoziierenden Substanzen und wurde von der BDF mittels der Software ACD logD Suite 4.5 berechnet.

Die Testlösungen decken ein weites Spektrum an physikochemischen Eigenschaften, wie hohe Hydro- bzw. Lipophilie sowie Molekulargewicht/-größe ab. Als Donor- und Akzeptormedium diente PBS, auf ölige oder komplex zusammengesetzte Zubereitungen wurde bewusst verzichtet. Um Substanzen mit geringer Löslichkeit in PBS zu lösen, erfolgte der Zusatz des Lösungsvermittlers Igepal[®] CA-630 in das Donor- und/oder Akzeptormedium in möglichst geringer Menge (Kaca et al., in press). Auch für die Versuche mit Benzoesäure (Akzeptor) und Flufenaminsäure (Donor) mussten die PBS-Puffer auf Grund von Löslichkeitsproblemen leicht modifiziert werden. Durch Zusatz der radioaktiv markierten Stammlösungen der Testsubstanzen bei der Analytik mittels LSC enthielten die Donorlösungen sehr geringe Mengen an EtOH. Zur exakten Angleichung der Donorlösungen für die Substanzen, die sowohl mittels LSC als auch HPLC quantifiziert wurden, erfolgten entsprechende Zusätze an EtOH in den Donor, wenn die Analytik mittels HPLC erfolgte.

Zur Vorbereitung auf die Permeationsversuche wurden von der ACB für jede Substanz die Sättigungslöslichkeit in PBS bestimmt (Kaca et al., in press). Anhand der Daten konnte somit für jede Testsubstanz überprüft werden, ob die maximal erreichte Konzentration im Akzeptormedium 10 % der

2 Material und Methoden

Sättigungslöslichkeit nicht überstieg. Sättigungsphänomene im Akzeptormedium konnten bei allen Versuchen ausgeschlossen werden, die Bedingungen für Infinite-dose-Versuche waren gewährleistet.

Tab. 1: Physikochemische Eigenschaften, Konzentrationen sowie Donor- und Akzeptormedien der in die Studie eingeschlossenen Testsubstanzen

| Test-substanz | MM ^a | logD ^b | log P _{o/w} ^c | Konz. [%] (µg/cm ²) | Donor-medium | Akzeptor-medium |
|------------------------|-----------------|-------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|--|
| Mannitol | 182,2 | -4,67 | -4,67 | 0,1 (284,1) | PBS | PBS |
| Benzoessäure | 122,1 | -1,25 | 1,90 | 0,1 (284,1) | PBS | PBS ^d |
| Koffein | 194,2 | -0,08 | -0,08 | 0,1 (284,1) | PBS | PBS |
| Nikotin | 162,2 | 0,02 | 0,72 | 0,1 (284,1) | PBS | PBS |
| Digoxin | 780,9 | 1,14 | 1,14 | 0,001 (2,841) | PBS | PBS |
| Flufenaminsäure | 281,2 | 2,03 | 4,80 | 0,075 (213,1) | Sörensen-Puffer | Sörensen-Puffer |
| Testosteron | 288,4 | 3,47 | 3,47 | 0,004 (11,36) | PBS + 2 % (v/v) Igepal [®] | PBS |
| Clotrimazol | 344,8 | 5,74 | 5,76 | 0,025 (71,0) | PBS + 2 % (v/v) Igepal [®] | PBS + 0,05 % (v/v) Igepal [®] |
| Ivermectin B1a | 875,1 | 6,82 | 6,82 | 0,1 (284,1) | PBS + 2 % (v/v) Igepal [®] | PBS + 0,02 % (v/v) Igepal [®] |

^arelative Molekülmasse [g/mol]

^bberechnet von der Beiersdorf AG mit der ACD logD Suite 4.5 Software für pH 7,4

^clog des Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizienten

^dmit 4fach höherer Pufferkapazität

Herstellung. Die Testsubstanzlösungen für die abschließende Validierung wurden gemäß der von der ACB erstellten SOP zur Herstellung der Donor- und Akzeptormedien vor Versuchsbeginn frisch hergestellt.

Mannitol. Zur Herstellung des Donors wurden 50 mg Mannitol in 50 mL PBS gelöst (1 mg/mL).

Zur Quantifizierung mittels LSC erfolgte der Zusatz von 10 µL radioaktiver Stammlösung D-[1-¹⁴C]-Mannitol zu 1 mL nicht markierter Testlösung. Der Donor enthielt somit 0,2 % (v/v) EtOH und hatte eine Gesamtaktivität von 0,074 MBq/mL.

Als Akzeptor wurde PBS mit normaler Pufferkapazität verwendet.

Koffein. Analog zu Mannitol (keine eigenen Untersuchungen).

Benzoessäure. Zur Herstellung des Donors wurden 50 mg Benzoessäure in 50 mL PBS gelöst (1 mg/mL). Die Quantifizierung erfolgte mittels HPLC.

Als Akzeptor wurde PBS mit 4fach erhöhter Pufferkapazität verwendet.

Nikotin. Zur Herstellung des Donors wurden 50 mg Nikotin in 50 mL PBS gelöst (1 mg/mL).

Zur Quantifizierung mittels LSC erfolgte der Zusatz von 8 μ L radioaktiver Stammlösung L-(-)-[N-Methyl- 3 H]-Nicotin zu 4 mL nicht markierter Testlösung. Der Donor enthielt 0,2 % (v/v) EtOH und hatte eine Gesamtaktivität von 0,074 MBq/mL.

Als Akzeptor wurde PBS mit normaler Pufferkapazität verwendet.

Digoxin. Zur Herstellung des Donors wurden 1 mg Digoxin in 100 mL PBS gelöst (10 μ g/mL). Die Behandlung der Lösung im Ultraschallbad für 30 min. beschleunigte das Lösen.

Die radioaktive Markierung der Testlösung mit radioaktivem [3 H(G)]-Digoxin erfolgte analog wie bei Nikotin. Der Donor enthielt 0,2 % (v/v) EtOH und hatte eine Gesamtaktivität von 0,074 MBq/mL.

Als Akzeptor wurde PBS mit normaler Pufferkapazität eingesetzt.

Flufenaminsäure. Zur Herstellung des Donors wurden 75 mg Flufenaminsäure in 100 mL isotonischen Sörensen-Puffer pH 7,4 nach 2facher Behandlung von 15 und 30 min. im Ultraschallbad und anschließendem Rühren bei 32 °C über Nacht gelöst (750 μ g/mL).

Als Akzeptor wurde isotonischer Sörensen-Puffer pH 7,4 eingesetzt.

Testosteron. In der Methoden- bzw. Protokollentwicklung wurden im Rahmen der Optimierung der Donor- und Akzeptorlösungen folgende unterschiedliche Testosteron-Testlösungen eingesetzt:

Donorlösungen:

- 0,004 %ige Lösung (40 μ g/mL) in Miglyol[®] 812/EtOH 90:10 (v/v)
100 mg Testosteron wurden in 10 mL EtOH gelöst. Aus dieser ethanolischen Stammlösung wurden 400 μ L entnommen, auf 10 mL mit EtOH ergänzt und anschließend mit 90 mL Miglyol[®] 812 gemischt.
- 0,004 %ige Lösung (40 μ g/mL) in PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630

Akzeptorlösungen:

- PBS + 5 % (m/v) BSA
- PBS + 0,5 % (v/v) Igepal[®] CA-630

Als optimierte Donorlösung diente im Rahmen des Protokolltransfers, Prävalidierung und Validierung die 0,004 %ige Lösung (40 µg/mL) in PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630, die durch Verdünnen von 200 µL einer ethanolischen Testosteron-Stammlösung (10 mg/mL) mit PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 auf 50 mL erhalten wurde. Durch vorsichtiges Mischen ist die auftretende Schaumbildung reduziert worden.

Im Rahmen der Finite-dose-Untersuchungen mit Testosteron wurde zusätzlich eine 0,0004 %ige (4 µg/mL) Lösung eingesetzt, die analog zur 0,004 %igen Lösung (40 µg/mL) hergestellt und radioaktiv markiert wurde.

Die radioaktive Markierung der Testlösung mit radioaktivem [1, 2, 6, 7-³H]-Testosteron erfolgte analog wie bei Nikotin und Digoxin. Der Donor enthielt 0,42 % (v/v) EtOH, 0,18 % (v/v) Toluol und 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630. Die Gesamtaktivität betrug 0,074 MBq/mL.

Als Akzeptor diente PBS mit normaler Pufferkapazität.

Clotrimazol. Zur Herstellung des Donors wurden 50 mg Clotrimazol in 200 mL (250 µg/mL) PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 + 0,2 % EtOH (v/v) unter einmaliger Behandlung im Ultraschallbad für 5 min., stufenweises Zugeben des Puffers und kräftigem Rühren unter Erwärmen auf ca. 40 °C für 1 h, gelöst.

Die radioaktive Markierung der Testlösung mit radioaktivem [³H]-Clotrimazol erfolgte analog wie bei Nikotin, Digoxin und Testosteron. Der Donor enthielt 0,4 % (v/v) EtOH und 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630. Die Gesamtaktivität beträgt 0,074 MBq/mL.

Wegen der begrenzten Löslichkeit von Clotrimazol in PBS, wurde PBS unter Zugabe von 0,05 % (v/v) Igepal[®] CA-630 als Akzeptor verwendet.

Ivermectin. Zur Herstellung des Donors wurden 50 mg Ivermectin unter dreimaliger Behandlung im Ultraschallbad für 30 min., stufenweises Zugeben des Puffers und Rühren über Nacht bei 32° C in 50 mL PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630, gelöst (1 mg/mL). Die Donorlösung enthielt 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 und 0,4 % (v/v) EtOH.

2 Material und Methoden

Wegen der begrenzten Löslichkeit von Ivermectin in PBS, wurde PBS unter Zugabe von 0,02 % (v/v) Igepal[®] CA-630 im Akzeptor verwendet.

Permeationsuntersuchungen unter Infinite-dose-Bedingungen. Für die Permeationsversuche wurden statische Franz-Diffusionszellen verwendet, deren Volumen ($12 \pm 0,5$ mL) durch Auslitern bestimmt worden ist. Der Durchmesser der Franzzellen betrug 15 mm. Nach Aufsetzen der Glaszylinder für den Donor auf die Franzzelle betrug die Diffusionsfläche $1,76$ cm². Abb. 4 zeigt den Versuchsaufbau.



Abb. 4: Foto des Versuchsaufbaus mit Franz-Diffusionszellen: 1 = auf 33,5 °C temperiertes Wasserbad (Thermostat); 2 = Magnetrührer; 3 = an das Wasserbad angeschlossene Franzzellen mit Donordeckel und Klammer

Vor Versuchsbeginn wurden die Franzzellen mit Akzeptormedium befüllt und das Wasserbad der Zellen auf $33,5 \pm 0,5$ °C temperiert. Abweichend davon erfolgte im Rahmen der Methodenentwicklung zunächst eine Temperierung des Wasserbads auf 37 °C. Die Umdrehungszahl des Magnetrührers wurde mit einem Drehzahlmessgerät auf 500 rpm eingestellt. Vor dem Aufspannen der Häute bzw. der RHE wurde die Umgebungstemperatur sowie die Temperatur des Akzeptormediums protokolliert.

Die geringere Größe des EPISKIN[®]-Modells (1,07 cm²) im Vergleich zu den anderen RHE-Modellen erforderte bei Versuchen mit dem EPISKIN[®]-Modell eine Anpassung der Diffusionsfläche. Ein Adapter aus Teflon reduzierte den Durchmesser der Franzzellen von 15 auf 7 mm und die Diffusionsfläche von 1,76 auf 0,385 cm². Durch Verdrängung des Akzeptormediums durch den Adapter betrug das Akzeptorvolumen 11,4 mL. Der Teflon-Adapter ist von der Universität des Saarlandes entwickelt, hergestellt und ausführlich beschrieben worden. Permeationsuntersuchungen mit Methylenblau zeigten, dass der Teflon-Adapter keinen Einfluss auf die Permeation hatte (Netzlaff et al., 2007). Die Hautstücke wurden mit einer Pinzette vorsichtig auf den Franzzellen zentriert. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen unter der Membran eingeschlossen wurden. Nach der Fixierung der Hautstücke mit den zu den Franzzellen gehörenden Glaszylindern und einer Äquilibrierungsphase von 30 min. wurde Akzeptormedium (Nullprobe) entnommen. Das Akzeptormedium wurde wieder bis zum Eichstrich aufgefüllt und anschließend die Hautoberfläche mit 500 µL (284,1 µL/cm²) der Donorlösung beschickt. Bei Versuchen mit dem EPISKIN[®]-Modell wurden, der kleineren Oberfläche entsprechend, 110 µL der Donorlösung appliziert. Der Verschluss der Donor-Glaszylinder erfolgte mit Parafilm[™].

Zur Entnahme der Proben (je 400 µL) dienten Einmalspritzen und –kanülen, der Probenzug erfolgte aus der Mitte der Akzeptorkammer. Für jede Franzzelle fand dabei dieselbe Spritzen-Kanülen-Kombination Verwendung. Zur gleichmäßigen Verteilung des Inhalts des Entnahmerohrs wurde vor der endgültigen Entnahme ein Volumen von 400 µL mit Hilfe der Spritzenskalierung aus der Mitte der Akzeptorkammer aufgezogen und wieder zurückgegeben. Eventuell entstandene Luftblasen unterhalb der Haut wurden durch vorsichtiges Schwenken der Franzzelle entfernt und die Franzzellen wieder mit Akzeptormedium bis zum Eichstrich aufgefüllt. Die Zeitpunkte der Probeentnahmen richteten sich nach der Testsubstanz und der eingesetzten Testhaut und wurden in Vorversuchen experimentell ermittelt. In der Regel erfolgten die Probeentnahmen bei Versuchen mit RHE über 8 h und bei Versuchen mit Human- und Schweinehaut über 26 h.

Zum Versuchsende wurden die eingespannten Häute abgenommen und, falls erforderlich, einer Weiterverarbeitung für den MTT-Test bzw. histologischen Untersuchungen zugeführt.

Methode zur Standardisierung der Franz-Diffusionszellen-Versuche. Für die Methoden- und Protokollentwicklung wurde von der TiHo eine Methode zur Standardisierung der Versuche in der Franz-Diffusionszelle definiert. Durch den Einsatz einer standardisierten, nicht-biologischen Diffusionsbarriere konnten barriereunabhängige Variationsfaktoren identifiziert werden. Als Donor diente eine 1%ige-Methylenblau-Lösung (Aqua dem.). Da Methylenblau sehr rasch in das Akzeptormedium (Aqua dem.) permeierte, war die Durchführung des Versuchs in kurzer Zeit möglich. Hinzu kam die robuste und einfache photometrische Analytik von Methylenblau, die auf Grund des hohen Extinktionskoeffizienten im Bereich des sichtbaren Licht erfolgte. Die Durchführung der Versuchsserien mit der Standardmethode erfolgte wie oben beschrieben.

Permeationsuntersuchungen unter Finite-dose-Bedingungen. Aufbau und Durchführung der Permeations- und Penetrationsuntersuchungen mit Franz-Diffusionszellen unter Finite-dose-Bedingungen erfolgten gemäß der SOP „Vorbereitung und Durchführung von Finite-dose-Penetrations-/Permeationsversuchen mit Koffein und Testosteron“, die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde. Die Handhabung der Testhäute erfolgte wie oben beschrieben. Als Testlösungen dienten radioaktiv markierte Testosteron-Lösungen in PBS unter Zusatz von 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 + 0,4 % (v/v) EtOH mit Konzentrationen von 40 und 4 µg/mL. Nach der Äquilibrationsphase von 30 min. und Entnahme der Nullproben wurde die Hautoberfläche mit 17,6 µL (10 µL/cm²) der Donorlösung beschickt. Die genaue und reproduzierbare Applikation wurde durch Bestimmung des Pipettierfehlers mittels einer Feinwaage überprüft. Dieser lag bei allen Versuchen zwischen 2,6 % und 4,3 %. Zur gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit auf der Hautoberfläche diente eine Teflonscheibe, die nach der Applikation der Donorlösung vorsichtig auf die behandelte Hautoberfläche gelegt wurde.

2 Material und Methoden

Zur Bestimmung der Permeation diente die Entnahme von Proben mit einem Volumen von 400 μL nach 0, 2, 4, 6 und 24 h. Nach Versuchsende wurden die an den Hautproben anhaftenden Reste der Testsubstanz 3fach mit je 500 μL Donormedium, PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630, vorsichtig abgespült und restliche Spülflüssigkeit durch Abtupfen mit einem Wattebausch vorsichtig entfernt. Der Deckel der Franzzelle und die Teflonscheibe wurden mit 2 mL Donormedium abgespült und anschließend die gesamte Spülflüssigkeit sowie der Wattebausch in ein 5 mL Messkolben überführt und mit PBS + 2 % (v/v) Igepal[®] CA-630 aufgefüllt. Nach Behandlung im Ultraschallbad für 5 min. wurde der Inhalt zentrifugiert und der Analytik zugeführt.

Zur Bestimmung der Penetration wurden der Haut/den RHE anhaftende Reste des Akzeptormediums mit einem Papiertuch abgetupft und die gesamte behandelte und unbehandelte Haut, sowie bei Versuchen mit HSE auch die Dialysemembran, mit 2 ml Soluene[®] 350 versetzt und über Nacht aufgelöst. Eigenlumineszenz des Soluene[®] 350 wurde durch Zugabe von 6 Tropfen konz. Essigsäure zu jeder Probe reduziert.

Vorbereitung von Humanhaut und hitzeseparierter humaner Epidermis.

Die Präparation von Humanhaut und Gewinnung von HSE erfolgte gemäß der von der US erstellten SOP „Präparation von Humanhaut (hitzeseparierte Humanepidermis)“. Die verwendeten Hautstücke aus Bauch- bzw. Brustregion von Frauen im Alter von 25 bis 75 Jahren fielen im Rahmen von plastischen Operationen an. Alter und Geschlecht der Spender/Innen, Hautareal, Zeitpunkt der Entnahme und Einfrierzeitpunkt wurden erfasst und dokumentiert. Die Häute wurden direkt im OP-Saal von subkutanem Fettgewebe befreit, um eine Kontamination des Stratum corneum mit Fettgewebe möglichst gering zu halten und den nativen Hydratationszustand der Haut zu erhalten. Zur Präparation wurde die Haut mit einer chirurgischen Pinzette gespannt und das subkutane Fettgewebe mit einem Skalpell direkt unterhalb der Dermis abgetrennt. Der Transport der präparierten und zugeschnittenen Hautstücke ins Labor erfolgte unter Kühlung. Im Labor wurden die aliquotierten Hautstücke in Aluminiumfolie eingeschlagen und nach Kennzeichnung waagrecht in Polyethylengefrierbeuteln annähernd luftdicht über max. 6 Monate bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

gelagert.

Zur Verbesserung der Handhabung der separierten Epidermis fand eine Cellulosestützmembran Verwendung. Zur Vorbereitung wurden quadratische Stücke (ca. 3 x 3 cm) aus der Cellulosemembran zugeschnitten und für 24 h in Aqua dem. hydratisiert. Vor Versuchsbeginn erfolgte dann eine Umhydratisierung im jeweiligen Akzeptormedium für 1 h. Zur Gewinnung hitzeseparierter Epidermis wurden die benötigten Hautstücke bei Raumtemperatur ca. 20 min. aufgetaut und das Stratum corneum mit einem mit Aqua dem. getränkten Zellstoffpapier vorsichtig gereinigt. Mittels eines Skalpells wurden quadratische Stücke (ca. 3 x 3 cm) zugeschnitten und diese mit einer anatomischen Pinzette für 60-90 sec. in ein Becherglas gelegt, dass mit auf 60 °C erwärmten destilliertem Wasser befüllt war. Anschließend wurde die Oberfläche des Hautstücks mit Filterpapier vorsichtig trocken getupft. Darauf erfolgte das Abpräparieren der Epidermis mit einer stumpfen Pinzette durch vorsichtiges Ziehen vom Rand des Hautstückes her. Die abpräparierte Epidermis wurde in einer Petrischale für 30 min. im Akzeptormedium hydratisiert, wobei sich die Epidermis vollständig entfaltete. Die hydratisierte Epidermis wurde mittels einer Pinzette vorsichtig mit der Stratum-corneum-Seite zur Donorkammer auf den Deckel der Franzzelle aufgebracht, anschließend die hydratisierte Cellulosemembran unter die Epidermis geschoben und der Deckel mit Hilfe einer Metallklammer fixiert.

Vorbereitung von Schweinehaut und Spalthautgewinnung. Schweinehaut wurde von der TiHo (Versand auf Trockeneis) sowie von der Medizinischen Fakultät Charité, Campus Virchow Klinikum in Berlin bezogen. Spendertiere gehörten zur Deutschen Landrasse in einem Alter von 5 bis 8 Monaten und wogen bei der Schlachtung 70 bis 100 kg. Die Gewinnung und Präparation der Schweinehaut erfolgte gemäß der SOP „Gewinnung und Vorbereitung von Schweinehaut für den Einsatz in der Franz-Diffusionszelle“. Die aliquotierten Hautstücke wurden in Aluminiumfolie eingeschlagen und in einem Gefrierbeutel waagrecht annähernd luftdicht über einen Zeitraum von max. 6 Monaten bei – 20 °C gelagert.

Da eine reproduzierbare Hitzeseparierung der Schweinehaut im Rahmen des Projektes nicht gelungen ist, wurde Spalthaut mit Dicken von $1000 \pm 100 \mu\text{m}$ verwendet. Die gefrorenen Hautstücke wurden zum Auftauen mit der Dermisseite auf eine Teflonunterlage gelegt und anschließend die Stratum-corneum-Seite mit etwas Aqua dem. abgespült und mit Zellstoff trocken getupft. Das Dermatom wurde auf eine Dicke von $1000 \mu\text{m}$ eingestellt und die fixierten Hautstücke auf eine Dicke von $1000 \pm 100 \mu\text{m}$ geschnitten. Um eine gleichmäßige Schnittfläche zu gewährleisten, wurde beim Dermatomisieren darauf geachtet, dass das Dermatom so gehalten wurde, dass die Klinge einen Winkel von ca. 30° zur Stratum-corneum-Seite aufwies und ein gleichmäßiger Schneidedruck eingehalten wurde. Aus den Hautstreifen erfolgte mittels eines Lochs Eisens das Herauslösen von Stanzen von ca. 3 cm Durchmesser. Die Dicke der Hautstanzen wurde mit einem Dickenmessgerät kontrolliert und protokolliert. Der Test auf Integrität wurde visuell durchgeführt. Die Hautstanzen wurden nicht mehr eingefroren, sondern nach Hydratisierung im auf ca. $33,5^\circ\text{C}$ erwärmten Akzeptormedium (30 min.) direkt für den Versuch eingesetzt.

Vorbereitung der rekonstruierten humanen Epidermis. Die RHE wurde in steril verpackten 6- bzw. 12-Well-Platten geliefert und entsprechend den Anweisungen des jeweiligen Herstellers gelagert und für den Versuch vorbereitet. Vor der Verwendung erfolgte die Überprüfung und Archivierung des mitgelieferten Technical Data Safety Sheet.

EpiDermTM

Verwendet wurde das Modell EPI-606-X mit einem Durchmesser von 22 mm, $4,00 \text{ cm}^2$, age day 14, von der Firma MatTek Corporation, Ashland, MA, USA. Erhaltungsmedium war Bestandteil des Kits, mitgeliefertes PBS wurde verworfen. Nach der Lieferung war sowohl eine Lagerung der RHE in der versiegelten 6-well-Platte im Kühlschrank bei 4°C für max. 48 h als auch eine sofortige Verwendung möglich.

Zur Vorbereitung auf den Versuch wurden die RHE-Inserts in einer Lamin Air[®] Sterilarbeitsbank einzeln entnommen. Eventuell noch anhaftende Agarose wurde durch leichtes Abstreifen auf steriles Filterpapier entfernt und die RHE in eine mit temperiertem (Raumtemperatur) Erhaltungsmedium gefüllte 6-well-

Platte (4 mL pro Well) überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die RHE nicht austrocknete und keine Luftblasen unter die Häute eingeschlossen wurden. Es erfolgte eine Inkubation über mindestens 1 h bei 37 °C bei 5 % CO₂ im Brutschrank.

Anschließend wurde die RHE in den Inserts von anhaftendem Erhaltungsmedium durch Abtupfen auf Filterpapier befreit. Da ein Ausstanzen der Häute aus den Inserts zu Schädigungen führte, wurden die Häute mit einem Skalpell herausgelöst und mit einer Pinzette entnommen, wobei darauf geachtet wurde, dass sich die Haut nicht von ihrer Stützmembran löste.

SkinEthic®

Verwendet wurde das SkinEthic® Skin Model RHE/L/17, Reconstructed Human Epidermis, large, 4,00 cm², age day 17, von der Firma SkinEthic laboratories, Nizza, Frankreich. Erhaltungsmedium war Bestandteil des Kits, mitgeliefertes PBS wurde verworfen. Eine Lagerung in Kühlschrank war nicht möglich. Daher wurde die RHE sofort nach Erhalt zur Inkubation vorbereitet, die analog wie bei EpiDerm™ beschrieben durchgeführt wurde. Es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank über Nacht, maximal über 48 h vor der Durchführung des Experiments. Ist der Versuch erst nach 24 h nach dem Erhalt der Häute erfolgt, wurde ein Mediumwechsel alle 24 h mit Erhaltungsmedium vorgenommen und die Lagerungsdauer dokumentiert.

Das Einbringen der RHE in die Franzzellen wurde wie bei EpiDerm™ beschrieben durchgeführt.

EPISKIN®

Verwendet wurde das Reconstructed Human Epidermis Kit EPISKIN® (age day: J13, 1,07 cm²) von der Firma EPISKIN SNC, Lyon, Frankreich, die im Jahr 2000 von L'OREAL als eigenes Zentrum für industrielle *in-vitro*-Rekonstruktion der Haut gegründet wurde. Der Transport der RHE durfte 48 h nicht überschreiten. Vor Öffnen des steril verpackten Kits wurden daher die Farbe des Agartransportmediums und die Temperaturindikatorfarbe des auf dem Kit angebrachten Temperaturstreifens geprüft. Eine Lagerung im Kühlschrank war ebenso nicht möglich. Daher wurde die RHE sofort nach Erhalt zur Inkubation

vorbereitet. Ist der Versuch erst nach 24 h nach dem Erhalt der Häute erfolgt, wurde wie bei SkinEthic[®] beschrieben vorgegangen.

Die Vorbereitung zur Inkubation erfolgte unter Verwendung einer mit temperiertem (Raumtemperatur) Erhaltungsmedium gefüllten 12-well-Platte (2 mL pro Well) analog wie bei den anderen RHE beschrieben. Die Inkubation erfolgte wie bei EpiDerm[™].

Die RHE wurde mit der von EPISKIN SNC empfohlenen Stanze für das EPISKIN[®]-Modell herausgelöst. Beim Ausstanzen wurde darauf geachtet, dass sich die Kollagenschicht nicht von der Haut löste. Das Aufbringen des EPISKIN[®]-Modells erfolgte wie bei den anderen RHE-Modellen.

Untersuchung der Viabilität von Hautproben. Die Viabilität von Hautproben wurde mittels des MTT-Tests gemäß der SOP „Anleitung zur Untersuchung der Viabilität von Hautproben“ der Ludwig-Maximilians-Universität München untersucht. Die Methode orientiert sich an dem für die Prüfung auf Korrosivität etablierten Verfahren (Liebsch et al., 2000). Das Messprinzip des MTT-Tests beruht auf der enzymatischen Bildung des blau gefärbten Formazans aus MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) durch Dehydrogenasen der Mitochondrien vitaler Zellen. Dieses kann photometrisch bei 520 nm quantifiziert werden.

Die Untersuchungen erfolgten nach Ende der Permeationsversuche. Von der mit den Testpräparaten behandelten Haut wurden Biopsiestanzen entnommen, wobei durch das Fixieren in den Franzzellen komprimierte Haut ausgespart und verworfen wurde. Eine 24-Well-Platte wurde mit je 300 µL frisch hergestellter MTT-Lösung beschickt und die Hautproben unter Lichtschutz 3 h ± 2 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die von anhaftender Flüssigkeit gereinigten Hautstücke in Röhrchen mit 400 µL Isopropanol, verschlossen mit Parafilm[™], über mindestens 3 h unter Lichtschutz unter vorsichtigem Schütteln und anschließender Behandlung von 30 sec. mit dem Vortex extrahiert. Die Farbintensität von 200 µL der Lösung wurde in einer 96-Well-Platte im Microplate Reader bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen. Parallel zu jeder Bestimmung erfolgten 2 Kontrollen mit PBS behandelte Haut

gleichen Ursprungs (Negativkontrolle). Als Leerwert dienten 200 μL Isopropanol.

Prüfung auf Integrität der Häute. Die Prüfung der Integrität der Häute erfolgte vor jedem Versuch visuell mit Hilfe einer Lupe. Zusätzlich wurde nach Einbringen der Häute in die Franzzellen und erfolgter Äquilibration vor dem Aufbringen des Donors die Oberfläche der Haut auf eventuell von der Akzeptorkammer durchgetretenes Akzeptormedium überprüft. Beschädigte Häute wurden verworfen.

2.2.2 Durchführung und Qualitätssicherung der Analytik

Liquid Scintillation Counting. Das Messprinzip des Liquid Scintillation Counting (Flüssigkeitsszintillationsmethode) beruht auf der Emission von Fluoreszenzlicht durch Fluore, die durch Radioaktivität zum fluoreszieren (= szintillieren) angeregt werden. Die Intensität des Fluoreszenzlichts ist proportional zu dem radioaktiven Zerfall in der Probe. Mittels LSC ist schwache, niedrig energetische Beta-Strahlung mit kurzer Reichweite (z. B. von Tritium: $E_{\text{max}} = 18 \text{ keV}$) quantitativ erfassbar. Die radioaktive Probe wird dabei mit einem Szintillationscocktail gemischt. In dieser Arbeit wurde Optiphase[®] Supermix verwendet, das organische Lösungsmittel, 2-(2-Butoxyethoxy)ethanol, kann bestimmte Mengen an wässrigen Medium aufnehmen, das Fluor ist Fluor-Poly(ethylenglycol)mono(4-nonylphenyl)ether.

Der größte Nachteil des LSC ist das Quenchen (engl. to quench = unterdrücken, auslöschen). Es tritt auf, wenn der Energietransferprozess von der radioaktiven Probe über das Lösungsmittel zum Fluor gestört wird (Williams and Wilson, 1978).

Bei der Bestimmung der Zählrate einer Probe werden zunächst cpm (= counts per minute)-Werte erhalten. Diese sind ein Maß für die Menge an Photo-Impulsen. Die cpm-Werte werden durch die Software des Beta-Counters in ccpm (corrected counts per minute) umgerechnet, bei der Unterschiede in der Effizienz der Photo-Detektoren ausgeglichen werden. Die ccpm-Werte geben aber keine Auskunft über die Aktivität, d. h. die „echten“ Zerfälle pro Minute. Dies wäre nur dann der Fall, wenn ein radioaktiver Zerfall genau einen Impuls verursachte. Um aus den ccpm-Werten die Aktivität der Probe zu bestimmen,

müsste auf dpm (disintegrations per minute)-Werte umgerechnet werden. Dabei ist mittels Quenchkorrekturmethode die Abhängigkeit des Quenchings von der Zähleffizienz (Quenchniveau) zu bestimmen. Doch ist nur bei Messwirkungsgradschwankungen und unterschiedlichem Quenching in jeder Probe eine dpm-Messung erforderlich. Sind alle Proben bis auf ihren Radioaktivitätsgehalt identisch, d. h. besitzen sie das gleiche Quenchniveau, wie die Proben, die im Rahmen der Permeations- und Penetrationsversuche gewonnen und einheitlich (gleiche Volumina, gleiche Zusammensetzung) aufgearbeitet wurden, ist der Einfluss des Quenchings auf die Messgenauigkeit sehr gering.

Testosteron, Mannitol, Digoxin, Nikotin und Clotrimazol wurden mittels Liquid Scintillation Counting quantifiziert. Die Proben aus den Versuchen sowie aus der zu jedem Versuch erstellten Kalibrierung wurden bei Raumtemperatur mit 1 ml Szintillationscocktail versetzt, ca. 10 sec. gemischt, in die Zählplatten des Beta-Counters überführt und vermessen.

Validierung

Die Validierung der analytischen Methoden erfolgte auf Grundlage der von der TiHo erstellten SOP „Validierung von Methoden bei der Substanzbestimmung mittels HPLC“ und der empfohlenen Literatur und Richtlinien (Grubbs, 1969; U.S., 1999; U.S., 2001).

Linearität

Zur Überprüfung der Linearität der analytischen Methode wurden 8 – 10 Leermatrixproben mit unterschiedlichen Mengen des Analyten äquidistant mit zwei Wiederholungen pro Stützpunkt dotiert (Tab. 2).

Die graphischen Auswertungen zeigten nach visueller Prüfung keine Ausreißer. Die Konzentrations-Detektorantwort war im gesamten Bereich der Kalibrierung linear. Auf eine statistische Absicherung der Residuen der linearen Kalibrierung auf Normalverteilung, Ausreißer und Vorliegen eines Trends konnte somit verzichtet werden.

Tab 2: Linearität: Konzentrationsbereiche und Bestimmtheitsmaße für Testosteron, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nikotin

| Substanz | Konzentrationsbereich [ng/mL] | Bestimmtheitsmaß |
|--------------------|--|-------------------------|
| Testosteron | 100 – 1000 | 0,9973 |
| Mannitol | 156,25 – 10000 | 0,9998 |
| Digoxin | 10 – 200 | 0,9955 |
| Clotrimazol | 90 – 2500 | 0,9987 |
| Nikotin | 200 – 10000 | 0,9982 |

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze (= Detektionsgrenze, limit of detection, LOD) beschreibt die niedrigste Konzentration eines Analyten, die unter den beschriebenen Bedingungen einen vom Leerwert unterscheidbares Instrumentensignal ergibt (U.S., 1999). Die Nachweisgrenze wurde nach der Leerwertmethode bestimmt. Zu diesem Zweck wurden 10 Leermatrixproben ($n = 10$) im Beta-Counter vermessen und die ccpm-Werte erfasst. Die Nachweisgrenze (NG) errechnet sich aus dem Mittelwert \bar{X} und der Standardabweichung s der Messreihe wie folgt:

$$[1] \quad NG = \bar{X} + 3 \cdot s$$

Die Erfassungsgrenze EG errechnet sich aus der Nachweisgrenze NG wie folgt:

$$[2] \quad EG = 2 \cdot NG$$

Die Bestimmungsgrenze BG (= Quantifikationsgrenze) errechnet sich näherungsweise als:

$$[3] \quad BG \approx 3 \cdot NG$$

Die Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für Testosteron, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nikotin sind in Tab. 3 zusammengefasst.

Tab. 3: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für Testosteron, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nikotin

| Substanz | Nachweisgrenze [ng/mL] | Erfassungsgrenze [ng/mL] | Bestimmungsgrenze [ng/mL] |
|-------------|------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Testosteron | 2,14 | 4,28 | 6,41 |
| Mannitol | 20 | 40 | 60 |
| Digoxin | 3,33 | 6,66 | 10 |
| Clotrimazol | 30 | 60 | 90 |
| Nikotin | 66,67 | 133,3 | 200 |

Reproduzierbarkeit / Präzision

Die Reproduzierbarkeit (Präzision) beschreibt die Übereinstimmung zwischen wiederholten Messungen an Aliquots identischer Proben. Bestimmt wurden die Wiederholpräzision s_w (Tagespräzision, intraday / within batch reproducibility), und Zwischenpräzision s_b (interday / between batch reproducibility).

Die Intraday-Reproduzierbarkeit von Testosteron, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nikotin wurde durch sechsmaliges Vermessen von jeweils 10 Leermatrixproben bestimmt, dotiert mit der höchsten (High Quality Control standard, HQC), der mittleren (Midrange Quality Control standard, MQC) sowie der niedrigsten Kalibrationskonzentration (Low Quality Control standard, LQC) an Analyten (Tab. 4).

Zur Bestimmung der Interday-Reproduzierbarkeit wurden jeweils 10 HQC, MQC und LQC-Proben an 5 unterschiedlichen Tagen hergestellt und quantifiziert (Tab. 4). Die Proben wurden zwischen den Analysen bei -20 °C gelagert und die Konzentrationen anhand der aktuellen Kalibrierung ermittelt. Alle Messwerte jeder Tagesreihe wurden auf Normalverteilung, Ausreißer und Trend untersucht, die Homogenität der Varianzen wurde mittels des Bartlett-Tests bestimmt.

Dazu wurde die Prüfgröße PG_{Bartlett} aus den Standardabweichungen s_i und den Freiheitsgraden f_i (Anzahl der Messungen $- 1$) der einzelnen Messreihen wie folgt gebildet:

$$[1] PG_{Bartlett} = 2.303 \cdot (G_1 - G_2)$$

$$[2] G_1 = \sum f_i \cdot \log \left(\frac{\sum f_i \cdot (1000 \cdot s_i)^2}{\sum f_i} \right)$$

$$[3] G_2 = \sum f_i \cdot \log(1000 \cdot s_i)^2$$

Ist die Prüfgröße $PG_{Bartlett}$ kleiner als der aus der statistischen Tabelle zu entnehmende kritische Wert, sind die Varianzen der Messreihen auf dem vorgegebenen Signifikanzniveau homogen.

Hatten alle Messreihen die Tests bestanden, wurden oben erwähnte Präzisionen wie folgt berechnet:

$$[4] s_w = \sqrt{\frac{\sum (f_{Tagesserie} \cdot s_{Tagesserie}^2)}{\sum f_{Tagesserie}}}$$

$$[5] s_b = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X}_{Tagesserie} - \bar{X}_{gesamt})^2}{f_{Tage}}}$$

$$[6] s_t = \sqrt{\frac{f_{Tage} \cdot s_b^2 + \sum f_{Tagesserie} \cdot s_w^2}{f_{Tage} + \sum f_{Tagesserie}}}$$

Relativ zum gemessenen Mittelwert dürfen die Präzisionen nicht mehr als 10 % bei HQC's und MQC's bzw. nicht mehr als 20% bei LQC's abweichen (Lindner and Wainer, 1998).

Tab. 4: Reproduzierbarkeit von Testosteron, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nikotin

| Substanz | Konzentrationen [ng/mL] | Intraday-Varianz [%] | Interday-Varianz [%] |
|-------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| Testosteron | 10; 500; 1000 | 2,9; 1,2; 0,5 | 3,1; 0,9; 0,8 |
| Mannitol | 100; 1000; 10000 | 0,9; 0,4; 0,2 | 1,2; 0,6; 0,4 |
| Digoxin | 10; 100; 1000 | 3,7; 0,9; 1,0 | 2,9; 1,4; 0,7 |
| Clotrimazol | 100; 1000; 2000 | 1,2; 0,8; 1,3 | 1,4; 1,1; 1,0 |
| Nikotin | 200; 1000; 10000 | 2,3; 1,4; 0,9 | 2,0; 1,2; 0,5 |

Stabilität der radioaktiven Stammlösungen

Alle radioaktiven Stammlösungen wurden bei – 20 °C gelagert. Bei diesen Lagerungsbedingungen gilt gemäß den Angaben der Hersteller bezüglich der Zersetzungsraten der Stammlösungen:

[1, 2, 6, 7-³H]-Testosteron. Im Mittel bei 0,18 % in der Woche, es ist keine höhere mittlere Zersetzungsraten als 0,28 % pro Woche zu erwarten.

D-[1-¹⁴C]-Mannitol. Nicht höher als 1 bis 2 % im Jahr

[³H(G)]-Digoxin. Ungefähr 2 % über 9 Monate

[³H]-Clotrimazol. Ungefähr 3 % über 6 Monate

L-(-)-[N-Methyl-³H]-Nikotin. Ungefähr 3 % über 6 Monate

HPLC-Analytik. Flufenaminsäure und Benzoesäure wurden ausschließlich mittels HPLC quantifiziert. Einen Überblick über die eingesetzten HPLC-Parameter gibt Tab. 5. Die Analytik der auf Trockeneis versandten Proben von Ivermectin erfolgte zentral von ACB mittels HPLC-LC-MS/MS-Kopplung.

Tab. 5: Parameter bei der HPLC-Analytik der Flufenaminsäure und Benzoesäure

| | Flufenaminsäure | Benzoesäure |
|------------------------------|--|--|
| Säule | LiChrospher® 100/RP-18 column/12.5 cm x 4 mm | LiChrospher® 100/RP-18 column/12.5 cm x 4 mm |
| Vorsäule | Lichrocart 4 – 4; LiChrospher® 100/RP-18 column (5 µm) | Lichrocart 4 – 4; LiChrospher® 100/RP-18 column (5 µm) |
| Mobile Phase | 80:20 (v/v) Methanol : McIlvaine Puffer pH 2,2 | 13:12 (v/v) Phosphatpuffer pH 2,6 : Acetonitril |
| Flußrate | 1,2 mL/min | 1,2 mL/min |
| Detektionswellenlänge | 284 nm | 284 nm |
| Injektionsvolumen | 50 µL | 50 µL |
| Retentionszeit | 3,09 ± 0,2 min | 3,60 ± 0,2 min |

Die Analytik der Flufenaminsäure erfolgte auf Basis der SOP „Bestimmung der Flufenaminsäure in PBS-Puffer“, erstellt von der US und für Benzoessäure auf Basis der SOP „Bestimmung der Benzoessäure in PBS-Puffer mit HPLC-UV“, erstellt von der TiHo.

Für Flufenaminsäure wurden die Proben nach dem Probenzug über maximal 24 h im Kühlschrank gelagert. Zwei Stunden vor der Analytik wurden Sie auf Raumtemperatur gebracht und vermessen. Die Proben (400 µL) aus Versuchen mit Benzoessäure wurden unmittelbar nach Probenzug oder direkt nach Versuchsende analysiert. Dazu wurden 200 µL von der Probe in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert, 2,0 µL Phosphorsäure (85 %ig) zugegeben und für 5 sec. gemischt. Die Proben entsprachen nun in ihrem pH-Wert dem im Eluenten verwendeten Phosphatpuffer.

Zum Ausschluss eines Messwertes wurden die von der US definierten Kriterien herangezogen:

- Form des Peaks entspricht nicht denen der Standards
- Massive Änderung der Retentionszeit
- Erkennbare Verunreinigungen der Probe (Störpeaks nahe am Hauptpeak)
- Verwerfen von Peakflächen unter 0,02 AU*min wegen zu großer Streuung der Ergebnisse

Validierung

Linearität

Zur Überprüfung der Linearität der analytischen Methode wurden 8 – 10 Kalibrierstandards frisch in PBS hergestellt (Tab. 6).

Tab 6: Linearität: Konzentrationsbereiche und Bestimmtheitsmaße für Flufenaminsäure und Benzoessäure

| Substanz | Konzentrationsbereich [ng/mL] | Bestimmtheitsmaß |
|------------------------|--|-------------------------|
| Flufenaminsäure | 125 – 15000 | 0,9998 |
| Benzoessäure | 50 – 4000 | 0,9999 |

Die UV-Absorptionen waren im gesamten Konzentrationsbereich linear. Auf eine statistische Absicherung der Residuen der linearen Kalibrierung auf Normalverteilung, Ausreißer und Vorliegen eines Trends konnte somit verzichtet werden.

Nachweis-, Erfassungs- und Quantifizierungsgrenze

Die Nachweis-, Erfassungs- und Quantifizierungsgrenzen wurden nach der Kalibrationskurvenmethode ermittelt (DIN, 1994) und sind in Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 7: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen für Flufenaminsäure und Benzoessäure

| Substanz | Nachweisgrenze [ng/mL] | Erfassungsgrenze [ng/mL] | Bestimmungsgrenze [ng/mL] |
|------------------------|-------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Flufenaminsäure | 40 | 80 | 120 |
| Benzoessäure | 15 | 30 | 50 |

Reproduzierbarkeit / Präzision

Die Intra- und Interday-Reproduzierbarkeit wurde analog wie bei der Validierung der Analytik mittels LSC beschrieben bestimmt (Tab. 8). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden zusätzlich vor Analysenbeginn alle Standards drei Mal injiziert. Die Abweichungen der korrespondierenden Peakflächen lagen dabei unter 5 %.

Tab. 8: Reproduzierbarkeit von Flufenaminsäure und Benzoessäure

| Substanz | Konzentrationen [ng/mL] | Intraday-Varianz [%] | Interday-Varianz [%] |
|------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Flufenaminsäure | 125; 7500; 15000 | 3,9; 2,3; 2,1 | 4,2; 2,4; 3,3 |
| Benzoessäure | 50; 2000; 4000 | 1,2; 0,9; 0,9 | 2,2; 3,1; 2,4 |

Stabilität des Analyten im Akzeptormedium

Die Substanzen (Standards) waren in PBS über 48 h im Kühlschrank stabil. Dies zeigten ebenso Stabilitätsuntersuchungen der US mit Flufenaminsäure und von der TiHo mit Benzoessäure.

2.2.3 Auswertung der Versuche und Statistik

Zur Erfassung der Rohdaten dienten Excel-Spreadsheets, die von der ZEBET in Zusammenarbeit mit der TiHo entwickelt und regelmäßig verfeinert wurden. Als Basis für die Anwendung der Spreadsheets dienten SOPs der ZEBET, SOP „Datenerfassung- und übermittlung mit Excel-Spreadsheets“ (Datenauswertung), „Rohdatenerfassung und -verrechnung mit Excel-Spreadsheets (HPLC)“ sowie „Rohdatenerfassung und -verrechnung mit Excel-Spreadsheets (Liquid Scintillation Counting)“. In die Spreadsheets zur Erfassung der Rohdaten wurden die ccpm-Werte der Proben aus der Analytik mittels LSC und der erstellten Kalibrierung gemäß eines festgelegten Belegungsplans der Zählplatten des Beta-Counters, bei der Analytik mittels HPLC, die AREA-Werte der Proben übertragen. Ferner wurden alle relevanten Versuchskonstanten und -variablen für jeden Versuch dokumentiert. Sodann erfolgte eine automatisierte Errechnung der Parameter der Kalibrierung sowie der Endpunkte der Versuche.

Bei Versuchen unter Infinite-dose-Bedingungen wurden bestimmt:

- Permeierte Substanzmenge in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ pro Messpunkt; Mittelwerte und Standardabweichung sowie Median, Minimum und Maximum pro Substanz für jede Franzzelle
- Angaben zum linearen Bereich:
 - Flux ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
 - Schnittpunkt mit der y-Achse
 - Bestimmtheitsmaß (r^2)
 - Lag-Zeit (h)
 - P_{app} -Wert (cm/sec)
 - Erster und letzter in die Berechnung einbezogener Wert
 - Anzahl der für die Berechnung herangezogenen Werte
 - Maximale Absorption ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$)
 - Recovery im Akzeptor und im Donor (%) (optional)

Bei Versuchen unter Finite-dose-Bedingungen wurden bestimmt:

- Permeierte Substanzmenge pro Messpunkt ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

- Recovery (Wiederfindungsrate bzw. Massenbilanz) bestehend aus wiedergefundener Menge im Donor („Auf der Haut“), Akzeptor (Permeation) und in der Haut (Penetration) (μg bzw. %)

Da bei der Analytik mittels HPLC mit höheren Substanzverlusten gerechnet wurde, ist, abweichend von den Vorgaben der OECD-Prüftichtlinien (s. 1.4.1, S. 16), bei Finite-dose-Experimenten eine Wiederfindungsrate (Massenbilanz) der Einzelversuche zwischen 100 ± 15 % als Qualitätskriterium definiert worden.

Bei der Berechnung des P_{app} -Wertes und der lag-Zeiten gemäß der unter 1.1.3 beschriebenen Gl. 4 wurde der lineare Teil der Permeationskurve zugrunde gelegt. Dabei wurden für das Volumen (V) der Franzzelle das ausgeliterte Volumen und für die Diffusionsfläche (A) die Fläche der Membran in Kontakt mit dem Akzeptormedium ($1,76$ bzw. $0,356$ cm^2 bei Versuchen mit dem EPISKIN[®]-Modell auf Grund kleinerer Dimensionen der RHE) eingesetzt. War der lineare Teil der Kurve von 6 bis 9 Datenpunkten gestützt, wurde ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 > 0,76$ oder $0,8$, bei nur 4 Datenpunkten ein Bestimmtheitsmaß von $r^2 > 0,9$ gefordert (Niedorf et al., in press). Lag-Zeiten waren nur dann valide berechenbar, wenn ein analytisch bedingter off-set der Permeationskurve (d. h. parallele Verschiebung der Permeationskurve zur x-Achse) ausgeschlossen werden konnte. Im Excel-Spreadsheet zur Datenauswertung erfolgte die Zusammenfassung und grafische Darstellung der Ergebnisse aus den Spreadsheets zur Erfassung der Rohdaten sowie die Berechnung der Intra- und Inter-batch-Präzision sowie der Gesamtpräzision für die P_{app} -Werte, permeierte Menge nach 6 h und 24 h (Infinite-dose) bzw. der Wiederfindungsrate (Finite-dose). Das Spreadsheet zur Datenauswertung diente der ZEBET als Grundlage für die statistischen Verechnungen.

Statistik. Im Verlauf des Projekts (Methodenentwicklung, -transfer, Prävalidierung und Validierung) wurden von der ZEBET die biostatistischen Methoden zur Auswertung der Ergebnisse regelmäßig den Erfordernissen angepasst und verfeinert. Für statistisch valide Aussagen wurden die Anzahl der Wiederholungen der Einzelversuche pro Charge, die Zahl der Versuche pro Labor sowie die Zahl der beteiligten Labore an den Parallelversuchen erhöht. So erfolgten die ersten Parallelversuche im Protokolltransfer in zwei Laboren

2 Material und Methoden

pro Testhaut und an mindestens drei unterschiedlichen Spenderhäuten für Human- und Schweinehaut, bzw. Chargen für RHE. In der Prävalidierung wurde folgendes Versuchsdesign festgelegt: Auf Grund der erwarteten höheren Streuung der Permeationsdaten bei HSE, erfolgten parallele Untersuchungen an HSE in drei, für Schweinehaut und den RHE in zwei Laboren. Versuche an HSE wurden an mindestens drei, für Schweinehaut und RHE an zwei unterschiedlichen Chargen vorgenommen. Pro Spender von Schweinehaut bzw. Charge von RHE wurden mindestens 4, bei HSE auf Grund der kleineren Hautstücke mindestens 3 Wiederholungen gefordert. Damit testete in der Prävalidierung jedes Labors eine Testsubstanz in 8 (bei HSE in 9) Einzelversuchen, insgesamt erfolgten 25 parallele Experimente mit jeder Substanz (Tab. 9).

Tab. 9: Spenderhäute von Human- und Schweinehaut sowie Chargen von RHE: Aufgabenzuordnung in der Prävalidierung; Spenderhäute/Chargen; **FU** = eigene Untersuchungen.

(Br: Brusthaut; Ab: Bauchhaut [Abdomen], T: Testosteron, K: Koffein)

| Testhaut | Labore | | | | |
|--------------------------------------|---|---|---|---|---|
| | FU | US | TiHo | LMU | ACB |
| HSE | Br, 39 ^K Br, 50 ^T Br, 55 ^K Br, 58 ^K Br, 72 ^T | Ab, 39 ^{T,K} Ab, 49 ^K Ab, 51 ^{T,K} | | Br, 30 ^{T,K} Br, 55 ^{T,K} Br, 52 ^{T,K} | |
| Schweinehaut | S030 ^K S032 ^K S033 ^T | | S027 ^K /S037 ^T S028 ^K /S040 ^T S034 ^K /S041 ^T | | |
| Euterhaut | | | R023 ^K /R031 ^K R034 ^K /R044 ^T R047 ^T /R045 ^T | | 126-0503 ^K 178-0904 ^K 179-0904 ^K 180-0904 ^K 181-0904 ^T 183-1104 ^T 184-1104 ^T |
| SkinEthic® (04/05 022A) | 0414 ^{T,K} 0501 ^{T,K} | | 0402 ^K /0702 ^K 0503 ^K /0704 ^K 0405 ^T /0501 ^T 0406 ^T / | | |
| EpiDerm™ | 5025 ^K /5412 ^K 5034 ^T 5036 ^T | | | 5025 ^{T,K} 5412 ^{T,K} 5619 ^{T,K} | |
| EPISKIN® (04 EPIS-) J13 | | 021 ^{T,K} 022 ^{T,K} 031 ^{T,K} | | | 014 ^{T,K} 015 ^{T,K} 018 ^{T,K} 031 ^{T,K} |

2 Material und Methoden

Die P_{app} -Werte wurden einer zwei-faktoriellen Varianzanalyse unterzogen (ANOVA) mit dem Faktor Haut (6 Faktorstufen) und dem Faktor Labor (5 Faktorstufen). Die Intra- und Interlaborvarianzen wurden auf Grundlage der DIN ISO 5725-2 berechnet (DIN, 2002).

In der Validierungsphase wurde jede Testhaut in drei Laboren jeweils an mindestens drei verschiedenen Spenderhäuten (HSE und Schweinehaut) bzw. Chargen (RHE) in jeweils 3 parallelen Versuchen getestet, um auch für die neuen Testsubstanzen eine zuverlässige Stichprobengröße zu gewährleisten. Damit ergab sich eine Mindestanzahl von 9 Versuchen für jede Testsubstanz pro ausführendes Labor, also insgesamt 27 (oder mehr) parallele Versuche mit jeder Substanz (Tab. 10).

Tab. 10: Versuchsdesign und Aufgabenzuordnung in der Validierung:

Mit Ausnahme von Ivermectin wurde jede Testhaut in drei Laboren parallel getestet. Die Versuche erfolgten an insgesamt drei unabhängigen Spenderhäuten (HSE und Schweinehaut) bzw. Chargen (RHE) und jeweils in 3facher Wiederholung pro Spenderhaut/Charge; **FU** = eigene Untersuchungen.

| Testsubstanz | Schweinehaut | HSE | EpiDerm™ | EPISKIN® | SkinEthic® |
|------------------------|---------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Koffein | TUB BASF TiHo | ACB LMU BASF | LMU BASF US | ACB IGB US | IGB TiHo ACB |
| Flufenaminsäure | FU BDF TiHo | US BASF ACB | US BDF LMU | ACB US IGB | US TiHo ACB |
| Mannitol | FU BDF BASF | FU ACB LMU | BDF LMU FU | ACB FU BASF | FU LMU ACB |
| Testosteron | FU TIHO BASF | FU US IGB | FU BASF LMU | ACB IGB US | TiHo US IGB |
| Ivermectin | FU | ACB | US | ACB | US |
| Benzoessäure | TiHo BDF FU | US IGB FU | BDF TUB IGB | US BASF ACB | TiHo TUB FU |
| Nikotin | TiHo ACB BASF | US IGB ACB | BDF IGB BASF | US BASF ACB | ACB TiHo FU |
| Digoxin | TiHo FU BDF | ACB BDF LMU | BDF FU BASF | LMU FU ACB | TUB ACB TiHo |
| Clotrimazol | TiHo FU BASF | LMU FU ACB | LMU FU BASF | LMU FU ACB | LMU FU TiHo |

2 Material und Methoden

Von diesem Vorgehen wurde nur bei Ivermectin abgewichen, da dieses wie erwartet bereits in ersten Versuchen keine Permeation zeigte. Damit konnten Untersuchungen auf ein einzelnes Labor beschränkt werden, das an drei unterschiedlichen Spenderhäuten bzw. Chargen jeweils in 3facher Wiederholung pro Spenderhaut/Charge prüfte.

Analog zur Prävalidierung wurde für jede Testsubstanz die Varianz der P_{app} -Werte mittels ANOVA ausgewertet. Infolge ungleicher Varianzen kam schließlich der Tamhane-Test für paarweise Vergleiche zur Auswertung. Ebenso wurde die Intra- und Interlaborvariabilität berechnet. Die experimentell ermittelten P_{app} -Werte wurden außerdem zu theoretisch errechneten in Beziehung gesetzt (Potts and Guy, 1991; Potts and Guy, 1992; Wilschut et al., 1995). Zur Berechnung dienten die Programme DERWIN Version 1.43 (U.S. Environmental Protection Agency, 2000) und SKINPERM Version 3.2 (Wilschut et al., 1995).

Die abschließenden Finite-dose-Untersuchungen erfolgten mit Koffein und Testosteron jeweils in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (Faktor 10). Jeweils eine Testhaut wurde exemplarisch in einem Labor getestet. Die Versuche erfolgten an insgesamt drei unabhängigen Spenderhäuten (HSE und Schweinehaut) bzw. Chargen (RHE) und jeweils in 3facher Wiederholung pro Spenderhaut/Charge. Tab. 11 gibt eine Übersicht über die Verteilung der Finite-dose-Versuche auf die beteiligten Labore.

Tab. 11: Aufgabenzuordnung bei den Finite-dose-Untersuchungen:

Die Versuche erfolgten an insgesamt drei Spenderhäuten (HSE und Schweinehaut) bzw. Chargen (RHE) in jeweils 3facher Wiederholung pro Spenderhaut/Charge; **FU** = eigene Untersuchungen.

| Substanz | Schweinehaut | HSE | EpiDerm™ |
|----------------------|--------------|-----|----------|
| Koffein 1 % | BDF | US | ACB |
| Koffein 0,1 % | BDF | US | ACB |
| Testosteron 0,004 % | BDF | FU | BASF |
| Testosteron 0,0004 % | BDF | FU | BASF |

Auf Grund der soliden Datenbasis aus den Infinite-dose-Versuchen konnte auf eine Wiederholung in weiteren Laboren verzichtet werden.