

**Standardarbeitsvorschrift im Rahmen des
BMBF Verbundvorhabens**
Validierungsstudie zur Prüfung auf Hautpenetration mit Hilfe von
biotechnologisch hergestellten Hautmodellen

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotonischen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		Version 04	SOP_AL_LSC_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum 07.12.2004	gültig ab 07.12.2004	Ersteller Alexander Vuia	Seite 1	von 11
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01	07.12.2004	Erstausgabe		
02	14.01.2005	Ergänzung Mannitol		
03	07.07.2005	Ergänzung Digoxin, Clotrimazol und Nicotin		
04	08.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Alexander Vuia		Geprüft: Sylvia Schreiber	Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting	
BMBF-Partner der Phase 1 und 2				
Freie Universität Berlin (FU), Tierärztliche Hochschule Hannover (TiHo), Universität des Saarlandes (US), Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU), ZEBET Berlin, Across Barriers (ACB), Institut für Grenzflächen- und Bioverfahrenstechnik, Fraunhofer (IGB), BASF AG (BASF), Beiersdorf AG (BDF), Cognis Deutschland GmbH & Co.KG (CND), Technische Universität Carolo-Wilhelmina-Braunschweig (TUB)				

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni-schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	2	11

Inhaltsverzeichnis	Seite
1 ZWECK	3
2 EINSATZBEREICH	3
3 GERÄTE, GERÄTE-EINSTELLUNGEN UND MATERIAL	3
3.1 Chemikalien und Lösungen	3
3.2 Kalibrierungen	5
3.2.1 Testosteron	5
3.2.2 Coffein	5
3.2.3 Mannitol	6
3.2.4 Digoxin	6
3.2.5 Clotrimazol	6
3.2.6 Nicotin	7
3.3 Beta-Counter	7
3.4 Weitere Geräte	7
4 PROBENVORBEREITUNG	7
5 VALIDIERUNG	8
5.1 Linearität	8
5.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze	8
5.3 Stabilität des Analyten	9
5.3.1 Testosteron	9
5.3.2 Coffein	9
5.3.3 Mannitol	10
5.3.4 Digoxin	10
5.3.5 Clotrimazol	10
5.3.6 Nicotin	10
6 AUSWERTUNG	10
7 REINIGUNG UND ENTSORGUNG	11
8 MITGELTENDE UNTERLAGEN	11

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotonischem Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	3	11

1 Zweck

Diese Standardarbeitsanweisung beschreibt die Durchführung und Validierung der Analytik von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotonischem Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS) mittels Liquid Scintillation Counting (LSC).

2 Einsatzbereich

Bestimmung der Testosteron-, Coffein-, Mannitol-, Digoxin-, Clotrimazol- und Nicotinkonzentration im Akzeptormedium bei Permeationsversuchen in der Franz-Diffusionszelle im Rahmen des BMBF-Projekts.

3 Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

3.1 Chemikalien und Lösungen

- isotonischer Phosphatpuffer pH 7,4 (PBS):

Normale Pufferkapazität:

KCl	0,2g
NaCl	8,0g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	1,44g
oder Na ₂ HPO ₄	1,1486g
in aqua bidest. ad	1l

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

Die entsprechenden Mengen der Salze sind mit Aqua bidest. anzusetzen. Nach Messung des pH-Werts wird die Lösung durch Filtermembranen mit einem Porendurchmesser von 0.22 µm steril filtriert und in verschließbaren Glasflaschen bei 4°C gelagert.

- Optiphase „Supermix“ Liquid Szintillation Cocktail (Perkin Elmer, Rodgau – Jügesheim, Produkt-Nr.: 1200-429)

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotonischen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	4	11

- 4-Androsten-17 β ol-3-on (Testosteron) (Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr.: T1500)
- Ethanol absolut (Merck, Darmstadt, 8.18760.2500)
- Igepal CA 630 (Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr.: I3021)
- [1,2,6,7 – ^3H] – Testosteron:
Toluol:Ethanol (9:1)
Spez. Aktivität: 3,7 TBq/mmol
37 MBq (1mCi) in 1,0 ml
(Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Produkt-Nr.: TRK-402)
- Coffein (Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr.: C0750)
- [^{14}C]-Coffein
0,5 ml Ethanol
Spez. Aktivität: 1,9 GBq/mmol
1,85 MBq in 0,5 ml
(Perkin Elmer, Rodgau – Jügesheim, Produkt Nr.: NEC412050UC)
- D-Mannitol USP (Sigma, Deisenhofen, Produkt Nr.: M-8429)
- D-[^{14}C]-Mannitol
Aquos solution+2%Ethanol, sterilized
1,85-2,29 GBq/mmol
7,4 MBq/ml
(Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Produkt-Nr.: CFA-238)
- Digoxin (Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr.: D6003)
- [^3H (G)]-Digoxin
1.0 mCi/ml in Ethanol
Spez. Aktivität: 23.5 Ci/mmol (0.87 TBq/mmol)
37 MBq/ml
(Perkin Elmer, Rodgau – Jügesheim, Produkt-Nr.: NET-222250UC)
- Clotrimazol (Sigma, Deisenhofen, Produkt-Nr.: C6019)
- [^3H]-Clotrimazole
1,0 mCi/ml in Ethanol
Spez. Aktivität: 8 Ci/mmol
37 MBq/ml
(Moravek Biochemicals, Brea California, USA, Produkt-Nr.: MT-1519)

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni-schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	5	11

- (+/-)-Nicotine (Sigma Deisenhofen, Produkt-Nr.: N0267)
- L-(-)-[N-Methyl-³H]-Nicotine
1.0 mCi/ml in Ethanol
Spez. Aktivität: 66.9 Ci/mmol (2.48 TBq/mmol)
37 MBq/ml
(Perkin Elmer, Rodgau – Jügesheim, Produkt-Nr.: NET-827001MC)

3.2 Kalibrierungen

Alle Kalibrierungsstandards werden im gleichen Medium (=Akzeptormedium) wie die zu vermessenden Proben hergestellt.

3.2.1 Testosteron

Eine Testosteron-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS** verwendet.

Da der Gültigkeitsbereich der Kalibrierung der Messbereich ist und keine Extrapolationen zulässig sind, werden dem radioaktiven Ansatz über entsprechende Verdünnungsschritte die Punkte der Kalibrierung so gelegt, dass diese möglichst symmetrisch den zu erwartenden Messbereiches abbilden. Um die Präzision der linearen Regression zu erhöhen, ist auf annähernde Äquidistanz der Kalibrierpunkte zu achten. Dabei sollte der unterste (oberste) Punkt des Messbereiches als Minimalwert (Maximalwert) gelten (optimal je einen weiteren Punkt außerhalb). Es müssen mindestens 4 (äquidistante) Stützstellen vorhanden sein, mit möglichst drei Messpunkten pro Punkt der Kalibrierungsgeraden.

3.2.2 Coffein

Eine Coffein-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Titel Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni- schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		Version 04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/ CL/NI_04	
Erstausgabedatum 07.12.2004	gültig ab 07.12.2004	Ersteller Alexander Vuia	Seite 6	von 11

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Do-
nor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS** verwendet.

Aus dieser Lösung erfolgen gemäß 3.2.1 die erforderlichen Verdünnungsschritte.

3.2.3 Mannitol

Eine Mannitol-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösun-
gen hergestellt.

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Do-
nor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS** verwendet.

Aus dieser Lösung erfolgen gemäß 3.2.1 die erforderlichen Verdünnungsschritte.

3.2.4 Digoxin

Eine Digoxin-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösun-
gen hergestellt.

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Do-
nor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS** verwendet.

Aus dieser Lösung erfolgen gemäß 3.2.1 die erforderlichen Verdünnungsschritte.

3.2.5 Clotrimazol

Eine Clotrimazol-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlö-
sungen hergestellt.

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Do-
nor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS + 0,05% (v/v) Igepal CA 630** verwendet.

Aus dieser Lösung erfolgen gemäß 3.2.1 die erforderlichen Verdünnungsschritte.

Titel Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni- schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		Version 04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/ CL/NI_04	
Erstausgabedatum 07.12.2004	gültig ab 07.12.2004	Ersteller Alexander Vuia	Seite 7	von 11

3.2.6 Nicotin

Eine Nicotin-Lösung wird gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Der radioaktive Ansatz der Lösung wird ebenso gemäß der SOP_Herstellung von den Donor- und Akzeptorlösungen hergestellt.

Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird **PBS** verwendet.

Aus dieser Lösung erfolgen gemäß 3.2.1 die erforderlichen Verdünnungsschritte.

3.3 Beta-Counter

- 1450 MicoBeta™ Plus Liquid Szintillation Counter (Wallac, Finnland) oder andere Beta-Counter
- Counting-time: 1 min
- Software: Programmversion 1.30
- Platten: Flexible PET-A-plastic, 1450-102 cassettes (Wallac, Finnland)

3.4 Weitere Geräte

- Mixer: z.B. Vortex (Heidolph, Kellheim)
- Eppendorf-Pipettierhilfen
- Proben-Vials: 2,0 ml PP Eppendorf-Tubes
- Messkolben: 10 ml, 50 ml
- Messpipette: 5 ml

4 Probenvorbereitung

Die aus dem Akzeptormedium entnommenen Proben werden maximal für 24h im Kühlschrank bei 4-8°C gelagert. Zwei Stunden vor Analysenbeginn werden diese auf Raumtemperatur gebracht.

Die aus dem Akzeptormedium entnommenen und die zur Kalibrierung hergestellten Proben (0,4 ml Probenvolumen in 2,0 ml Vials) werden mit 1 ml Szintillationscocktail versetzt, für ca.

Titel Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni- schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		Version 04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/ CL/NI_04	
Erstausgabedatum 07.12.2004	gültig ab 07.12.2004	Ersteller Alexander Vuia	Seite 8	von 11

10 Sekunden gemischt und anschließend in die Zählplatten des Beta-Counters gemäß Belegungsplane überführt und vermessen.

5 Validierung

5.1 Linearität

Zur Überprüfung der Linearität der Methoden wurden 8 – 10 Leermatrixproben mit unterschiedlichen Mengen des Analyten äquidistant mit zwei Wiederholungen pro Stützpunkt dotiert:

Analyt	Gewählte Konzentrationen	Bestimmtheitsmaß
Testosteron	100 – 1000 ng/ml	0,9973
Coffein	156,25 – 10000 ng/ml	0,9997
Mannitol	156,25 - 10000 ng/ml	0,9998
Digoxin	10 – 200 ng/ml	0,9955
Clotrimazol	90 – 2500 ng/ml	0,9987
Nicotin	200 – 10000 ng/ml	0,9982

Tab. 1: Konzentrationsbereiche und Bestimmtheitsmaße

Die graphischen Auswertungen zeigten nach visueller Prüfung keine Ausreißer. Die Konzentrations-Detektorantwort ist im gesamten Bereich der Kalibrationsreihen linear. Auf eine statistische Absicherung der Residuen der linearen Kalibration auf Normalverteilung, Ausreißer und Vorliegen eines Trends wurde verzichtet.

5.2 Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze

Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze wurden gemäß der SOP_Validierung nach der Leerwertmethode bestimmt. Es wurde das Instrumentensignal an insgesamt 10 Leermatrixproben erfasst:

Titel Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni- schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		Version 04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/ CL/NI_04	
Erstausgabedatum 07.12.2004	gültig ab 07.12.2004	Ersteller Alexander Vuia	Seite 9	von 11

Substanz	Nachweisgrenze [ng/ml]	Erfassungsgrenze [ng/ml]	Bestimmungsgrenze [ng/ml]
Testosteron	2,14	4,28	6,41
Coffein	22	44	66
Mannitol	20	40	60
Digoxin	3,33	6,66	10
Clotrimazol	30	60	90
Nicotin	66,67	133,3	200

Tab. 2.: Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen

5.3 Stabilität des Analyten

5.3.1 Testosteron

Die Stabilität von nicht radioaktiv markiertem Testosteron wurde von der Across Barriers GmbH bestimmt. Testosteron ist 24h bei Raumtemperatur, bei 4°C und bei 37°C stabil; die jeweiligen Abweichungen vom t_0 -Wert liegen nur bei -0,4%, 2,4% und 2,0%.

Die radioaktiven Testosteron-Stammlösungen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei -20°C gelagert. Gemäß den Angaben des Herstellers liegt die Zersetzung bei diesen Bedingungen im Mittel bei 0,18% in der Woche und es ist keine höhere mittlere Zersetzungsrate als 0,28% pro Woche zu erwarten.

5.3.2 Coffein

Die Stabilität von nicht radioaktiv markiertem Coffein wurde von der Across Barriers GmbH bestimmt. Für Coffein ist über 24h bei Raumtemperatur, bei 4°C und bei 37°C eine Stabilität belegt. Die Abweichungen vom t_0 -Wert liegen nur bei 2,5 %, 2,0 % und 2,4 %.

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni-schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	10	11

Die radioaktive Coffein-Stammlösung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei 4-8°C gelagert. Gemäß den Angaben des Herstellers liegt die Zersetzung bei diesen Bedingungen nicht höher als 1-2% im Jahr.

5.3.3 Mannitol

Die radioaktive Mannitol-Stammlösung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei -20°C gelagert. Gemäß den Angaben des Herstellers liegt die Zersetzung bei diesen Bedingungen nicht höher als 1-2% im Jahr.

5.3.4 Digoxin

Die radioaktive Digoxin-Stammlösung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei -20°C gelagert. Gemäß den Angaben des Herstellers liegt die Zersetzung bei diesen Bedingungen bei ungefähr 2% über 9 Monate.

5.3.5 Clotrimazol

Die radioaktive Clotrimazol-Stammlösung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei -20°C gelagert. Es sind keine Angaben des Herstellers über die Zersetzungsrates vorhanden.

5.3.6 Nicotin

Die radioaktive Nicotin-Stammlösung wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers bei -20°C gelagert. Gemäß den Angaben des Herstellers liegt die Zersetzung bei diesen Bedingungen bei ungefähr 3% über 6 Monate.

6 Auswertung

Die Messung des Beta-Counters erfolgt in cpm (counts per minute). Diese werden durch die Software in ccpm (corrected count rate) umgerechnet, bei der Unterschiede in der Effizienz der Detektoren ausgeglichen werden. Die erhaltenen ccpm-Werte können direkt zur Auswertung herangezogen werden, da durch die einheitliche Probenvorbereitung der Kalibrierung-

Titel		Version		
Bestimmung von Testosteron, Coffein, Mannitol, Digoxin, Clotrimazol und Nicotin in isotoni-schen Phosphatpuffer pH 7,4 mittels Liquid Scintillation Counting		04	SOP_AL_CO/TE/MA/DI/CL/NI_04	
Erstausgabedatum	gültig ab	Ersteller	Seite	von
07.12.2004	07.12.2004	Alexander Vuia	11	11

und Messproben Proben mit einen nahezu konstanten Messwirkungsgrad vorliegen, d.h. keine Schwankungen im Quenchniveau auftreten. Die Proben eines Assays können somit miteinander verglichen und für die weitere Datenauswertung verwendet werden. Nur bei Messwirkungsgradschwankungen und Quench in der Probe bedarf es einer dpm-Messung.

Die Auswertung der ccpm-Daten erfolgt in den von ZEBET erstellten spreadsheets. In diese werden die erhaltenen Daten aus den Dateien des Beta-Counters in den Belegungsplan der spreadsheets kopiert.

7 Reinigung und Entsorgung

Die mit Szintillationsflüssigkeit gefüllten Proben werden ungeöffnet in dafür vorgesehene Behälter überführt und der Entsorgung von radioaktivem Abfall gemäß Strahlenschutzverordnung zugeführt. Alle weiteren radioaktiven Abfälle werden gemäß Punkt 6.1 der SOP „Vorbereitung und Durchführung von Permeationsversuchen in Franz-Diffusionszellen mit verschiedenen Hautqualitäten“ entsorgt.

8 Mitgeltende Unterlagen

- SOP_M_FZ_03
- SOP_M_Herstellung von Donor- und Akzeptorlösungen
- SOP_DO_DA_01
- SOP_DO_RD_LSC_01