



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

Standard Operating Procedure (SOP)

Titel Bestimmung von Benzoessäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf		Seite von 1 6
Ausgabe	gültig ab	Beschreibung der Änderung		
01	15.01.2003	Erste Ausgabe		
02	25.07.2003	Inhaltsverzeichnis zugefügt, Reproduzierbarkeit angefügt		
03	01.04.2004	Analytik Coffein und Testosteron zugefügt		
04	06.12.2004	Kalibrationsbereiche definiert		
05	07.03.2005	Formale Anpassung der Seite 1		
06	11.02.2008	Redaktionelle Anpassung		
Genehmigung: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting				
Erstellt: Dr. Frank Niedorf		Geprüft: Prof. Manfred Kietzmann		Genehmigt: Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Verteiler: 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)				

Titel Bestimmung von Benzoessäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf	Seite 2	von 6

Inhaltsverzeichnis

1. Zweck	3
2. Einsatzbereich	3
3. Geräte, Geräteeinstellungen und Material	3
3.1 Chemikalien und Lösungen	3
3.2 Kalibrationsreihe	4
3.3 HPLC	4
3.4 Weitere Geräte	5
4. Probenvorbereitung	5
5. Validierung	6
6. Reinigung und Entsorgung	6

Titel Bestimmung von Benzoesäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf	Seite 3	von 6

1. Zweck

Diese Standardarbeitsanweisung beschreibt die Durchführung der Analytik von Benzoesäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit Hilfe der HPLC.

2. Einsatzbereich

Bestimmung der Benzoesäure-, Coffein und Testosteronkonzentration im Akzeptormedium bei Diffusionsversuchen in der Franz-Diffusionszelle.

3. Geräte, Geräte-Einstellungen und Material

3.1 Chemikalien und Lösungen

PBS-Puffer (pH 7,4; normale Pufferkapazität): siehe SOP_M_LÖS_04

Phosphatpuffer (10 mM, pH 2,6): $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 0,68 g/l

Phosphorsäure (85%): 0,34 ml/l

Phosphorsäure (8.5%): Hergestellt als 1:10 Verdünnung von 85%-Phosphorsäure mit Aqua Bidest

Alle Merck, Darmstadt

Acetonitril, HPLC-grade (LabScan, Dublin, Irland)

Benzoesäure, Coffein, Testosteron (Sigma, Deisenhofen)

3.2 Kalibrationsreihe

Die Stammlösungen von Benzoesäure und Coffein haben Konzentrationen von 1mg/ml. Bei Testosteron beträgt diese 40 µg/ml. Kalibrationsstandards werden im Kalibrationsbereich zwischen 10 µg/ml und 10 ng/ml durch Verdünnung der Stammlösung mit PBS erstellt. Dabei werden jeweils drei unabhängige Proben einer bestimmten Konzentration erstellt und chromatographisch quantifiziert. Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die für die jeweiligen Substanzen und Membranen zu benutzenden Probenkonzentrationen.

Titel Bestimmung von Benzoesäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf	Seite 4	von 6

	Mensch	Schwein	Rind	Skinethic
Benzoessäure		10, 250, 500	10, 3000, 6000, 10000	10, 4000, 8000, 12000
Coffein	10, 500, 1000	10, 3000, 6000, 10000	10, 3000, 6000, 10000	10, 3000, 6000, 10000
Testosteron	10, 250, 500	10, 250, 500	10, 300, 600, 1000	10, 3000, 6000, 10000

Tabelle 1: Übersicht über die zu benutzenden Kalibrationsstandards (Konzentration, ng/ml)

3.3 HPLC

Pumpe: System Gold Model 125, Beckman (Fullerton, CA, USA)

Fluss: 1,2 ml/min

Detektor: System Gold Model 166, Beckman (Fullerton, CA, USA)

Detektion: 230 nm

Autosampler: Modell 816, Spark (Emmen, Niederlande)

Software: 32 Karat, Beckman (Fullerton, CA, USA)

Säulenofen: SPH 99, Spark (Emmen, Niederlande)

Temperatur: 40°C

Säule: Merck LiChrospher 100 RP18e, 125-4, Korngröße 5 µm

Injektionsvolumen: 100 µl

Titel Bestimmung von Benzoesäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf	Seite 5	von 6

	Eluent	Flussrate	Detektionswellenlänge
Benzoessäure	30% Acetonitril 70% Phosphatpuffer	1,2 ml/min	230 nm
Coffein	10% Acetonitril 90% Phosphatpuffer	1 ml/min	270 nm
Testosteron	45% Acetonitril 55% Phosphatpuffer	1 ml/min	245 nm

3.4 Weitere Geräte

Mischer: Reax Top (Heidolph)

Einstellung: 1800 RpM

Eppendorf-Pipettierhilfen

Reaktionsgefäße: 1,5 ml, PP (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen)

Proben-Vials: 8 mm Gewindeflaschen, 1,1 ml, spitz zulaufender Boden
(Wicom, Heppenheim)

4. Probenvorbereitung

Die Proben werden bei Zimmertemperatur aufgetaut und für 5 Sekunden gemischt. Von der Probe werden 400 µl in ein HPLC-Vial überpipettiert und mit 3,6 µl Phosphorsäure (8,5%) versetzt und für 5 Sekunden gemischt. Die Proben entsprechen nun in ihrem pH- Wert dem im Eluenten verwendeten Phosphatpuffer. Bei Coffeinproben werden zusätzlich 24 µl Acetonitril zugegeben, was zu einer Stabilisierung der Baseline führt.

Titel Bestimmung von Benzoessäure, Coffein und Testosteron in PBS-Puffer mit HPLC-UV		Version 06	Dokumentennr.: SOP_AL_HPLC_CO/TE/BZ_TIHO_06	
Erstausgabedatum 15.01.2003	gültig ab 06.12.2003	Ersteller Dr. Frank Niedorf	Seite 6	von 6

5. Validierung

Die Validierung erfolgt gemäß SOP_AL_HPLC_VAL_04

6. Reinigung und Entsorgung

Lösungsmittelabfälle sind im Chemikalienabfall (Lösemittelgemische, keine halogenierten Lösungsmittel enthaltend) zu entsorgen. Zwischen den Proben wird die Nadel und die Probenschleife durch den Autosampler selbst gereinigt. Als Flush-Eluent ist für Coffein und Benzoessäure Wasser, für Testosteron 80% Acetonitril zu verwenden.

Zur Entfernung von Pufferrückständen sowie von fest an der Säule haftenden Stoffen ist die Anlage für mindestens 15 Minuten zunächst mit 10% Acetonitril und anschließend für mindestens 15 Minuten mit 80% Acetonitril bei einem Fluss von 1,2 ml/min zu betreiben. Der Pumpenkolben ist mit 50 ml Aqua demineralisata zu reinigen, anschließend muss die Spülflüssigkeit mit Hilfe von Luft wieder aus dem Kolbenraum entfernt werden.