



**Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung des
Taurins in verschiedenen biologischen Matrices und
Untersuchungen der Diffusion des Taurins durch die exzidierte
Humanhaut**

Dissertation

zur Erlangung des Akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Msc.Chem. Dayse Luzia Pinheiro da Silva
geboren am 14.11.1976 in Apodi-RN, Brasilien

Gutachter:

1. Prof. Dr. rer. nat. habil. Dr. h. c. R.H.H. Neubert
2. Doz. Dr. rer. nat. H.H.H. Rüttinger
3. Prof. Dr. rer. nat. W. Lindner

Halle (Saale)

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht in:

TAGUNGSBEITRAG

Silva, D.L.P.; Rüttinger, H.H.; Mrestani, Y.; Baum, W.F.; Neubert, R.H.H. Use of capillary electrophoresis to determine taurine in vehicle system and biological sample. In: 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2006, Geneva. Abstract: *APV Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik* (Poster)

ORIGINALBEITRÄGE

Silva, D.L.P.; Thiago, S.B.; Pessôa, F.A.; Mrestani, Y.; Rüttinger, H.H.; Wohlrab, J.; Neubert, R.H.H. Penetration profil of taurine in the human skin and its distribution in skin layers, *Pharmaceutical Research*, 2008, 25:1846-1850.

Silva, D.L.P.; Mrestani, Y.; Rüttinger, H.H.; Wohlrab, J.; Neubert, R. Comparison between fluorescence and pulsed integrated electrochemical detectors for the determination of taurine in human skin, urine and plasma by CE, *Chromatographie*, 2008, 67:813-817.

Silva, D.L.P.; Rüttinger, H.H.; Mrestani, Y.; Baum, W.F.; Neubert, R.H.H. Development of capillary electrophoresis methods for quantitative determination of taurine in vehicle system and biological media, *Electrophoresis*, 2006, 27:2330-2337.

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg auf Anregung und unter der Leitung von

Prof. Dr. Dr. R.H.H. Neubert.

Für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Überlassung der interessanten Thematik, seine zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Ratschläge, seinen Einsatz für dieses Thema und Bereitschaft zur Diskussion und seine Präsenz zu meiner Unterstützung, möchte ich meinem Doktorvater sehr herzlich danken.

Ganz besonderes möchte ich mich bei DAAD (Deutscher Akademischer Austauschdienst) für die finanzielle Unterstützung bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn PD Dr. J. Wohlrab recht herzlich für die praktische Durchführung des Hühnereitestes sowie die Diffusionszelle nach Franz und unermüdliche Diskussionsbereitschaft.

Ebenso gilt mein besonderer Dank Herrn Doz. Dr. Rüttinger für die intensiven und angenehmen Zusammenarbeiten bei der Kapillarelektrophorese, für sein Vertrauen und für die jederzeit vorhandene Diskussionsbereitschaft während meiner Promotion.

Mein Dank geht an Herrn Doz. Dr. Rüttinger für das kritische Gegenlesen und für Vorschläge, die diese Arbeit verbessert haben. Des Weiteren danke ich Torsten Hanke und Frau Peters für das Korrekturlesen der deutschsprachigen Manuskripte.

Ganz besonders möchte ich mich bedanken bei Herrn Doz. Dr. Rüttinger, Herrn Dr. Mrestani, Frau Peters, Frau Pöztch und Frau Lunow, für die angenehme und unkomplizierte Zusammenarbeit sowie die immer gute Laune im Labor. Ich danke für ihre Freundschaften, auf die ich mich immer verlassen konnte, und die schöne Zeit, in der wir so viel gelacht haben. Ich hoffe sehr, wir werden uns nie aus den Augen verlieren!

Danken möchte ich auch allen Spender die sich für diese Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Ich möchte mich weiterhin bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für die besonders freundliche Arbeitsatmosphäre.

INHALTSVERZEICHNIS

1	AUFGABESTELLUNG UND ZIELSETZUNG.....	1
2	THEORETISCHER TEIL.....	4
2.1	TAURIN.....	4
2.1.1	Geschichte und Chemie.....	4
2.1.2	Allgemein Aspekte zu Taurin.....	5
2.1.3	Taurin im Körper.....	7
2.2	GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG.....	9
2.2.1	Historischer Überblick.....	9
2.2.2	Geräteaufbau.....	10
2.2.3	Elektroosmotischer Fluss (EOF).....	11
2.2.4	Elektrophoretische Mobilität.....	13
2.2.5	Injektion in der Kapillarelektrophorese.....	15
2.2.6	Detektoren.....	17
2.2.7	Formen der Kapillarelektrophorese.....	23
2.3	HAUT.....	29
2.3.1	Aufbau der humanen Haut.....	29
2.3.2	Wirkungen des Taurins in der Haut.....	34
2.4	UNTERSUCHUNG DER PENETRATION.....	35
2.4.1	Mehrschichtmembranmodell (MSMM).....	36
2.4.2	Diffusionszelle nach Franz.....	37
2.5	TOXIZITÄT UNTERSUCHUNG – HÜHNER-EIER-TEST (HET-TEST).....	39
2.5.1	Allgemein.....	39
2.5.2	Problem Tierschutzgesetzgebung.....	39
3	EXPERIMENTELLER TEIL.....	41
3.1	CHEMIKALIEN.....	41
3.2	PUFFERLÖSUNGEN.....	43
3.3	STANDARDLÖSUNGEN.....	43
3.4	VORBEREITUNG DER BIOLOGISCHEN PROBEN.....	44
3.5	ANALYTISCHE METHODE – KAPILLARELEKTROPHORESE (CE).....	46
3.6	VALIDIERUNG DER CE-METHODE.....	49
3.7	LIBERATIONS- UND PENETRATIONSVERHALTEN.....	53
3.7.1	Durchführung der Versuche am in vitro Mehrschichtmembranmodell.....	54
3.7.2	Diffusionszelle nach Franz.....	55
3.8	TEST AUF VERTRÄGLICHKEIT.....	57
4	ERGEBNISSE.....	59
4.1	ENTWICKLUNG DER CE-METHODE – FLUORIMETRISCHER DETEKTOR.....	59
4.2	ENTWICKLUNG DER CE-METHODE – ELEKTROCHEMISCHER DETEKTOR.....	70
4.3	QUANTIFIZIERUNG DES TAURINS IN VERSCHIEDENEN BIOLOGISCHEN PROBEN.....	78
4.4	LIBERATIONS- UND PENETRATIONSVERHALTEN.....	79
4.4.1	Mehrschichtmembranmodell (MSMM).....	79
4.4.2	Diffusionszelle nach Franz.....	80
4.5	HÜHNEREI-TEST.....	83
5	DISKUSSION.....	84
5.1	KAPILLARELEKTROPHORESE.....	84
5.1.1	Methodenentwicklung.....	84
5.1.2	Vergleich zwischen fluorimetrische und elektrochemische Detektion.....	86
5.2	TAURINSPIEGEL IN DEN VERSCHIEDENEN BIOLOGISCHEN PROBEN.....	87
5.3	FREISETZUNGS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNGEN DES TAURINS.....	90
5.4	VERTRÄGLICHKEIT.....	91
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	93
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	95
8	ANHANG.....	116
9	LEBENSLAUF.....	119

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AAA	Aminosäuren-Auto-Analysator
Abb.	Abbildung
Brij® 35	Polyalkylenglykolether
°C	Grad Celsius
CAM	Chorionallantois-Membran
CE	Kapillarelektrophorese
cm	Zentimeter
DAC	Deutscher Arzneimittel-Codex
DR	Dermis
EOF	Elektroosmotischer Fluss
EP	Epidermis
ED	elektrochemischer Detektor
FD	fluorimetrischer Detektor
g	Gramm
h	Stunde
HET	<i>Hen's-egg-test</i> , Hühnereitest
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IPAD	integrierende gepulste amperometrische Detektion
IR	Infrarot
l	Liter
MEKC	mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie
min.	Minute
mM	Millimolar
µg	Mikrogramm
µM	Mikromol
<i>n</i>	Anzahl der Versuche
NaOH	Natriumhydroxid
PAD	gepulste amperometrische Detektion
pKa	Säurekonstante
RE	relative Error
RSD	relative Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SC	Stratum corneum
SD	absolute Standardabweichung
%	Bezeichnet stets Massenprozent
VK	Variationskoeffizient
W	prozentuale Wiederfindungsrate

1 AUFGABESTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Zur Bestimmung des Taurins in biologischen Matrices sind bislang, die Chromatographie-Ionenaustauschersäulen-Methode (Smeraldi, 1987; Panchenko, 1994; Forslund, 2000) sowie die HPLC-Methode (Yokoyama, 1991; McMahon, 1996; Filho, 1997; Inoue, 2003; Lallemand, 2004), publiziert worden. Leider finden sich in den Publikationen, die diese Methode beschreiben, kaum Informationen zur Validierung. Oftmals werden nur Angaben zur Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) und der unteren Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LOQ) gemacht. Ein Nachteil der HPLC-Methode liegt darin, dass der eingesetzte Fluoreszenzmarker OPA, insbesondere aber die Produkte der Derivatisierungsreaktion, die fluoreszierenden Isoindolverbindungen, sehr instabil sind. Dieser Umstand bedingt, dass Derivatisierungszeiten auf die Sekunde genau eingehalten werden müssen und dass Methoden, bei denen OPA als Derivatisierungsreagenz verwendet wird, kaum zu automatisieren sind.

Da sich HPLC-Methoden nur in begrenztem Umfang hierfür eignen, um Taurin selektiv in komplexer Matrix zu bestimmen und die GC-MS-Methode sehr kostenintensiv ist, wurde zur quantitativen Analyse des Taurins im Hautextrakt, Schweiß, Plasma und Urin die Kapillarelektrophorese (CE) ausgewählt. Im Gegensatz zur HPLC werden bei kapillarelektrophoretischen Methoden die Analyten nicht nach Lipophilie, sondern nach Größe und Ladung getrennt. Die Trennleistung der CE ist im Allgemeinen deutlich höher als die der HPLC, da keine Bandenverbreiterungen durch laminare Flussprofile entstehen (Altria, 1995). Des Weiteren besitzt die Kapillarelektrophorese im Vergleich zur HPLC mehrere Vorteile: Die Analytik ist im Mikromaßstab durchführbar, es werden nur minimale Menge an Probe benötigt, da die erforderliche Injektionsmenge, sowohl hydrostatische als auch hydrodynamische Injektion, im Nanoliter-Bereich liegt. Auch von dem eingesetzten Puffer und der Spüllösung werden nur Milliliter benötigt. Außerdem handelt es sich aufgrund der eingesetzten wässrigen Trennelektrolyte um eine kostengünstige und um weltfreundliche Methodik. Deshalb wurde die CE als alternative Methode zur Bestimmung des Taurin in den verschiedenen biologischen Proben ausgewählt. Die meistverbreitete Detektionsmethode in der CE ist die UV-Absorption. Da Taurin keine Chromophore enthält, muss es auf Kosten der Empfindlichkeit mit der indirekten Methode detektiert werden. Fluorimetrische Detektor besitzt eine hohe Empfindlichkeit. Aber nur einige Analyte fluoreszieren, alle andere (z. B.

Taurin) müssen derivatisiert werden. Eine interessante Möglichkeit um underivatisiertes Taurin bestimmen zu können ist durch die integrierte Pulseamperometrie.

Taurin zählt zu den häufigsten Aminosäuren im tierischen Organismus (Sturman, 1980). Erst in den letzten dreißig Jahren stieg das Interesse an dieser besonderen Aminosäure im Zusammenhang mit der Entdeckung von Taurinmangel-Symptomen bei Katzen und Hinweisen auf eine mögliche Bedeutung von Taurin in der menschlichen Ernährung gewaltig an. An erster Stelle unter den Symptomen eines klinisch manifesten Taurinmangels stehen Veränderungen der Retina und des *Tapetum lucidum* (Hayes, 1975). Ein Absinken der Taurin-Konzentration auf 75-50% des Normalwertes bedingt progressive Veränderungen der Funktion und Morphologie der Photorezeption und des *Tapetum lucidum*, die in schweren Fällen bis zur völligen Blindheit führen können (Hayes, 1989). Eine weitere Veränderung, die aus einem chronischen Taurinmangel beruht, betrifft das Herz (Pion, 1987). Organe mit besonders hohem Tauringehalt sind Skelettmuskeln, Herz, Gehirn und Leber. Es wird vermutet, dass ein gesunder Mensch von 70 kg Körpergewicht zwischen 30 und 70 g Taurin im Körper hat, davon ca. 75 % in Muskelzellen (Lombardini, 1992). Allerdings kann Taurin in einer niedrigeren Menge im Plasma, im Urin, in der Haut und im Schweiß nachgewiesen werden. Da das Taurinprofil in den biologischen Flüssigkeiten und in den Geweben eine wertvolle Bedeutung zur Untersuchung bei vielen Krankheiten haben kann, widmete sich der erste Teil dieser Dissertation den folgenden Punkten:

- Entwicklung von zwei kapillarelektrophoretischen Methoden (fluorimetrischer und elektrochemischer Detektoren) zur Bestimmung des Taurins.
- Validierung der entwickelten Methoden nach den Richtlinien der Food and Drug Administration (FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001);
- Quantifizierung des Taurins in verschiedenen biologischen Matrices (Plasma, Urin, Hautextrakt und Schweiß);
- Vergleich der beiden Methoden hinsichtlich der Empfindlichkeit, der Präzision, der Richtigkeit und des Tauringehaltes in den Matrices.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der möglichen dermalen Anwendung des Taurins als eine Therapieoption zur topischen Behandlung von Hautkrankheiten. Taurin besitzt einen antioxidante Effekt in der Zellproliferation, in der Hautreizung und in der Kollagensynthese. Taurin wird verwendet um die Oxidationsschädigungen zu vermeiden

(Högstrom, 1987). Topische Formulierung mit Taurin wurde entwickelt um die Wundheilung der Haut wegen der Bestrahlung zu verbessern (Değim, 2002). Taurin wird auch als ein Schutzmittel gegen (TGF)- β 1 („transforming“ Wachstumsfaktor), einer Hemmstoff vom *in vitro* Haarwuchs, angesehen. In Tests wurde nachgewiesen, dass bei isoliertem Haarfollikel durch die Zugabe von Taurin die Überlebensrate *in vitro* erhöht werden konnte (Collin, 2006). Eine Vielzahl von Patenten mit neuen topischen Formulierungen und Shampoos gegen Haarausfall, in dem Taurin ein Bestandteil ist, wurden in letzten Jahren publiziert. Jedoch wurden keine Untersuchungen über die Penetration von Taurin durch die Haut durchgeführt.

Aufgrund dieser Tatsachen bestehen die Ziele für den zweiten Teil der vorliegenden Arbeit aus:

- Untersuchung der Diffusion des Taurins in und durch die exzidierte Humanhaut;
- Quantifizierung des Taurins in verschiedenen Hautschichten (*Stratum corneum*, Epidermis und Dermis);
- Untersuchung der Freisetzung des Taurins aus der Basiscreme DAC mit einem Mehrschichtmembranmodell

2 THEORETISCHER TEIL

2.1 TAURIN

2.1.1 Geschichte und Chemie

Die Substanz Taurin wurde im Jahre 1827 von Chemikern Gmelin und Tiedemann aus Stiergalle durch Kochen mit Wasser isoliert und wurde zunächst Gallen-Asparagin genannt. Der Begriff „Taurin“ stammt von der lateinischen Bezeichnung für Stiergalle (*Bos taurus*) ab, und wird 1838 erstmal in der Literatur erwähnt. Chemisch ist Taurin eine β -Aminosulfonsäure (**Abbildung 2-1**). Das bedeutet, dass Taurin keine Carbonyl-, sondern eine Sulfonylgruppe als Säuregruppe aufweist, und dass die Aminogruppe, die sich bei klassischen Aminosäuren am α -C-Atom befindet, beim Taurin in β -Position steht (Wolffram, 1991). Taurin besitzt eine große Ähnlichkeit zum β -Alanin, wobei beim Taurin im Vergleich zum β -Alanin der hohe Säuregrad der Schwefelsäure auffallend ist. Auch die Aminogruppe ist im Vergleich zu verwandten Gruppen weniger basisch (Huxtable, 1992).

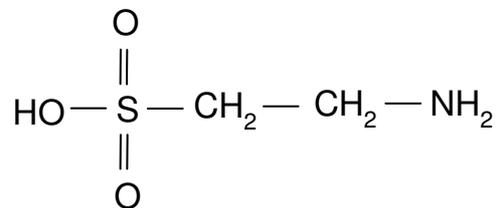


Abb. 2-1: Strukturformel des Taurins (CAS – Nr. 107-35-7).

Wie alle Aminosäuren ist Taurin ein amphoterischer Elektrolyt (isoelektrischer Punkt I.P. = 5,12), liegt aber im Vergleich zu Aminosäuren in wässriger Lösung bei physiologischem pH-Wert nahezu vollständig als Zwitterion vor, ist demnach stark lipophob und hat eine sehr gute Wasserlöslichkeit (circa 125,14 g/L bei 25°C) (Huxtable, 1992). Sowohl diese Säuregruppierung ($\text{pK}_a = 1,5$) als auch die basische Aminogruppe ($\text{pK}_b = 8,74$) besitzen eine höhere Azidität (niedriger pK-Wert) als die analogen Gruppierungen anderer Aminosäuren. Im physiologischen pH-Bereich um 7,4 liegt Taurin aufgrund der hohen Azidität fast komplett zwitterionisch vor. Durch seine lipophoben Eigenschaften ist die Diffusion des Taurins durch Membranen nicht möglich, für die Aufnahme ist ein Transportsystem notwendig (Graham, 2002).

2.1.2 Allgemeine Aspekte zu Taurin

Taurin ist eine organische Substanz, die in der Biosphäre weit verbreitet ist. Da die Sulfonsäuregruppe der Aminosäure keine Peptidbindung eingehen kann, ist Taurin nicht am Aufbau von Proteinen beteiligt und liegt im Körper nur in freier Form sowie zu einem viel geringeren Teil in Form von einfachen Peptiden vor. Säugetiere können Taurin zwar grundsätzlich aus den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin synthetisieren, allerdings sind einige Arten (Mensch, Katze und einige Affen-Arten) nicht in der Lage, ausreichende Mengen des Stoffes zu produzieren.

Die Leber ist das Organ mit der höchsten Syntheserate für Taurin, welches in einem Seitenweg des Katabolismus von schwefelhaltigen Aminosäuren entsteht (Timbrell, 1995). Über die Blutbahn erfolgt die Versorgung der Organe und Gewebe mit Taurin. Es liegen keine Informationen darüber vor, in welchem Umfang andere Organe und Gewebe in der Lage sind, endogen Taurin zu synthetisieren. Es gibt drei bekannte Wege für die Biosynthese von Taurin aus Cystein und alle drei Wege erfordern Pyridoxal-5`-Phosphat (P5P) (Birdsall, 1998; Dominy, 2004). Schwefelhaltige Aminosäuren wie Methionin und Cystein werden hier zu Cysteinsulfinat oxidiert. Der wichtigste Weg für Taurinssynthese führt über Hypotaurin. In diesem Fall, kann Cysteinsulfinat durch das Enzym Cysteinsulfinatdecarboxylase unter CO₂-Abspaltung zu Hypotaurin umgewandelt werden, welches weiter zu Taurin oxidiert wird (Huxtable, 1992) (**Abbildung 2-2**).

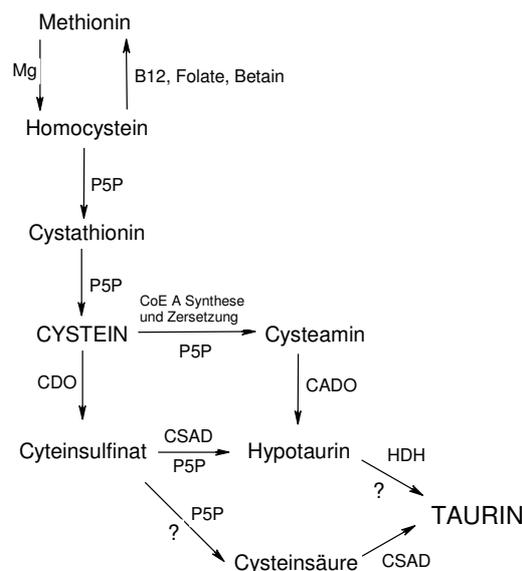


Abb. 2-2: Synthese von Taurin als Abbauprodukt des Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren (CoEA = Coenzym A; CDO = Cysteindioxygenase; CSAD = Cysteinsulfinatdecarboxylase; HDH = Hypotaurindehydrogenase; CADO = Cysteamin-dioxygenase).

Neben dem hepatischen Syntheseweg wurden noch alternative Wege in anderen Geweben wie dem Gehirn, dem Herzen oder der Niere vorgeschlagen, die allerdings alle die Aminosäure Cystein als Ausgangssubstanz haben (Wright, 1986). Über die effektive Höhe der Syntheserate bei Säugetieren und dem Menschen liegen leider keine verlässlichen Angaben vor. Die Kapazität zur Taurinsynthese variiert stark, nicht nur gewebespezifisch, sondern auch zwischen Spezies. Ratten und Mäuse scheinen eine größere Synthesekapazität für Taurin zu besitzen als der Mensch (Worden, 1985). Dagegen können beispielsweise Katzen Taurin gar nicht selbst synthetisieren. Sie müssen ihren Taurinbedarf zu 100% über die Nahrung decken (Huxtable, 1992).

Taurin selbst fördert vor allem in der frühen Entwicklungsstufe die Entwicklung des Embryos (Devreker, 1999). Ab der ersten Zellteilung (2-Zellstufe) sind erste osmoregulatorische Systeme vorhanden, die eine Taurinfreisetzung unter hypotonischen Bedingungen ermöglichen (Dumoulin, 1997). Bei der Entwicklung des embryonalen Hirns stimuliert Taurin sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung (Chen, 1998).

Der Großteil des täglichen Bedarfs wird für den Menschen über die Nahrungsaufnahme gedeckt (Huxtable, 1992). Während für den Menschen Taurin nicht als essentiell angesehen wird, da es aus Cystein oder Methionin synthetisiert werden kann, ist für Kinder hingegen Taurin essentiell. Algen und das gesamte Tierreich verfügen über hohe zelluläre Taurinkonzentrationen, während in Bakterien und höheren Pflanzen Taurin gar nicht oder nur in Spuren zu finden ist. In Säugetieren kann es bis 0,1% des Körpergewichts ausmachen und ist damit eines der häufigsten niedermolekularen organischen Moleküle (Huxtable, 1992). Während der Gehalt in Kuhmilch mit 5-7 mg/l relativ niedrig ist, liegt er in Muttermilch postnatal bei ungefähr 50 mg Taurin pro Liter, sinkt aber im Laufe der Stillzeit auf 25 mg/l. Taurinhaltige Nahrungsmittel sind entsprechend der Verbreitung des Taurins in der Natur Seefisch, Muskelfleisch von Rind, Schwein, Lamm und Geflügel sowie Käse.

Taurin übernimmt in Säugetieren wichtige Funktionen, beispielsweise die strukturelle und funktionelle Stabilisierung von Photorezeptoren in der Retina (Pasantés-Morales, 1984). Es spielt außerdem eine Rolle bei der Entwicklung des Gehirns (Sturman, 1975), der Osmoregulation, der Stabilisierung von Membranen (Huxtable, 1973) und bei Verdauungsvorgängen durch Konjugation mit Gallensäuren in der Leber (Spaeth, 1974; Vessey, 1977; Frison, 1979).

Taurin kann in Säugetierzellen nicht abgebaut werden, es kann lediglich unverändert oder in Form von Gallensalzen, wie zum Beispiel Taurocholat, ausgeschieden werden. Die einzige, bislang näher untersuchte metabolische Funktion von Taurin ist die Konjugation mit

Gallensäuren und damit die Beteiligung am enterohepatischen Kreislauf. Die dazu verwendete Menge beträgt aber lediglich ca. 1% des gesamten im Körper vorkommenden Taurins (Jacobsen, 1968). Die Gallensäure kann von Taurin oder Glycin konjugiert werden. Während Herbivoren wie Kaninchen und Meerschweinchen nur Glycinkonjugate der Gallensäuren bilden, können Carni- und Omnivoren wie der Mensch zusätzlich Taurinkonjugate synthetisieren. Katzen dagegen sind obligate Bildner von Taurinkonjugaten.

Bei den *in vitro* Untersuchungen zur Rolle von Osmolyten in Hautzellen stellte sich insbesondere für Taurin eine wichtige Rolle heraus, da die höchste Induzierbarkeit nach hyperosmotischem Stress und UVB-Bestrahlung beim Transporter für Taurin und die höchste Akkumulation für Taurin in den humanen Keratinozyten festgestellt wurde (Warskulat, 2004). Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass die Aufnahme von Taurin ein zentraler Teil einer Osmolytstrategie von epidermalen Zellen ist. Dieser Prozess hilft den Hautzellen möglicherweise, das Hydrationsgleichgewicht zu erhalten. Da der Erhalt des normalen Hydrationszustandes einer Zelle dessen Funktion beeinflusst, ist es denkbar, dass in Folge der Taurinaufnahme die zelluläre Widerstandskraft gegenüber exogenen Stressoren wie UVB erhöht werden kann.

2.1.3 Taurinspiegel im Körper

Die Verteilung des Taurins im Körper ist nicht gleichmäßig. Bestimmte Organe bzw. Gewebe, wie die Herz- und Skelettmuskulatur, das Nervengewebe, aber auch neutrophile Granulozyten und Thrombozyten, weisen einen besonders hohen Tauringehalt auf (Jacobsen, 1968; Sturman, 1980; Klein, 1983; Huxtable, 1989; Chesney, 1986). In den Körperflüssigkeiten, z.B. im Plasma, in der Zerebrospinalflüssigkeit und in der extrazellulären Flüssigkeit kommen Taurinkonzentrationen von ungefähr 10-100 $\mu\text{mol/l}$ vor (Übersicht bei Chesney, 1986; Huxtable, 1992; Wright, 1986). Pitkänen (2003) konnten im Blutserum von verschiedenen Patienten Konzentrationen im Bereich von 108-169 $\mu\text{mol/l}$ bestimmen. In der Literatur findet man recht übereinstimmende Angaben zum Taurin-Gehalt im Plasma. Der Normalwert des Plasma-Taurins beträgt nach Pion (1987) $82 \pm 33 \mu\text{mol/l}$, nach Hayes und Trautwein (1989) 50 – 120 $\mu\text{mol/l}$ und nach Fox (1993) 70 – 82 $\mu\text{mol/l}$.

Im Gegensatz zu diesen geringen extrazellulären Taurinkonzentrationen ist die intrazelluläre Konzentration in den Organen sehr viel höher. Die Gewebe mit den höchsten Taurinkonzentrationen sind die Retina, für die bis zu 80 mmol/l gemessen wurden, das Herz, das Gehirn und die Muskulatur. Auch in Blutplättchen, erregbaren Geweben und

sekretorischen Strukturen liegen hohe Taurinspiegel vor (Übersicht bei Chesney, 1986; Huxtable, 1992; Wright, 1986).

Die Abhängigkeit von taurinreicher Nahrung beim Erwachsenen ist noch unklar aufgrund des hohen Gesamttauringehaltes im Körper, der unter normalen Bedingungen relativ konstant gehalten werden kann. Eine Reduktion der Taurinkonzentration im Körper konnte nach Operationen, im Zustand der Sepsis oder des Traumas, bei Entzündungen, bei unterernährten Krebspatienten und bei der Epilepsie nachgewiesen werden (Chesney, 1986; O'Flaherty, 1997; Redmond, 1998). Dieser Mangel führt zu verschiedenen klinischen Bildern: Entwicklungsstörungen, Zerstörung der Retina, Immundefizienz, Entwicklung einer Kardiomyopathie und Beeinträchtigung des Zellwachstums mit daraus resultierender Wachstumsretardierung (Birdsall, 1998; Chesney, 1986; Martensson, 1987; Roe, 1966; Satoh, 1998; Zackheim, 1982). Kinder, die mit taurindefizienter Nahrung versorgt wurden, zeigten anormale Elektroretinogramme und hatten eine erhöhte Gefahr für eine Retinadegeneration (Ament, 1986).

Die Hauptausscheidung von Taurin erfolgt über die Niere. Die Aminosäure wird in den Glomeruli frei filtriert. Somit bestimmt das Ausmaß der Rückresorption aus dem primären Filtrat die ausgeschiedene Menge an Taurin. Die Niere ist in gewissem Umfang in der Lage, den Tauringehalt des Organismus zu regulieren. Bei einem hohen Plasma-Taurin-Spiegel erfolgt eine Reduktion der Rückresorption und damit eine vermehrte Ausscheidung. Entgegengesetzte Verhältnisse lassen sich bei einem Absinken des Taurin-Spiegels feststellen, d.h. also eine verstärkte Rückresorption und demzufolge eine verringerte Taurin-Ausscheidung über den Harn (Zelikovic, 1989; Chesney, 1986).

Während die allgemeinen Funktionen und die Verteilung von Taurin bereits in vielen Geweben und Organen diskutiert und untersucht wurden, existieren nur wenig Arbeiten zu Taurin in der Haut. Die Arbeitsgruppe um Lobo (2001) untersuchte die Konzentration und die Verteilung von Taurin in den oberen Hautschichten der Ratte. Die Aminosäure konnte in den vaskulären Endothelzellen der Dermis nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Epidermis stellte sich heraus, dass Taurin hauptsächlich in der Granularschicht und nur in zu einem geringen Teil im oberen Teil des *Stratum spinosum* vorhanden ist. In der Basalschicht, im unteren *Stratum spinosum* und im *Stratum corneum* konnte die Aminosäure nicht nachgewiesen werden. Nach Isolierung der verschiedenen Hautschichten und Bestimmung der Konzentration ließen sich die Aussagen konkretisieren. Während in den lebenden Schichten der Epidermis eine Konzentration von $7,1 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ Frischgewebe bestimmt wurde, betrug die des *Stratum corneum* nur $< 0,073 \pm 0,05 \mu\text{mol/g}$ Frischgewebe. Des

weiteren konnte durch die Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die Verteilung von Taurin in der Haut nicht konstant ist. Mit zunehmender Differenzierung kommt es zur Akkumulation der Aminosäure in den Keratinozyten. Bevor die Zellen die Hornschicht erreichen und im Anschluss daran von der Hautoberfläche abgeschilfert werden, kommt es zur Freisetzung des in den Zellen gespeicherten Taurins. Damit steht den Hautzellen neben der Aufnahme der Aminosäure aus dem Blut und der Biosynthese aus Cystein eine weitere Taurinquelle zur Verfügung (Lobo, 2001).

Dass Taurin in der Epidermis, besonders in den äußeren Schichten anzutreffen ist, stellt keine neue Erkenntnis dar. Beim Vergleich der Tauringehalte in der Hornschicht hautgesunder Probanden und Schuppenflechte-Patienten (Psoriasis) konnte Taurin in beiden Gruppen nachgewiesen werden (Kloss, 1967). Signifikante Unterschiede fanden sich zwischen beiden Patientengruppen jedoch nicht. An Ratten wurde versucht, durch orale Gabe von Taurin den Taurinspiegel in der Haut zu beeinflussen und so das Überleben von Hauttransplantaten sicherzustellen (Basher, 1995). Weder der Tauringehalt des Gewebes, noch folglich die Überlebensraten der Hautbiopsien ließen sich auf diesem Weg signifikant beeinflussen.

2.2 GRUNDLAGEN DER ELEKTROPHORETISCHEN TRENNUNG

2.2.1 Historischer Überblick

Im Jahre 1979 wurde das erste Gesetz von Kohlrausch (Gesetz der unabhängigen Ionenwanderung) formuliert: „Geladene Teilchen wandern in Lösung unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes mit unterschiedlicher Geschwindigkeit“. Das Trennprinzip wurde zuerst nur zur Erforschung physikalischer Grundlagen angewandt. Die Elektrophorese wurde 1937 als Trennmethode von Tiselius eingeführt. Im Jahre 1948 erhielt Tiselius den Nobelpreis für seine Arbeiten über die Analysen mittels Elektrophorese und Absorption, insbesondere für die Entdeckung der komplexen Natur von Serumproteinen (Nobel Lectures, 1964). Er hat entdeckt, dass ein Proteingemisch in einem mit Pufferlösung gefüllten Rohr bei Anlegen einer Spannung in eine Richtung wandert und dass die Wandergeschwindigkeit von der Ladung und der Mobilität der einzelnen Proteine abhängt. Die Trennleistung war durch die thermische Diffusion und die Konvektion eingeschränkt. Um diese Effekte zu vermeiden, wurden stabilisierte Gele verwendet, die auf eine Glasplatte gegossen wurden. Die Gelelektrophorese ist die meistverwendete analytische Methode in der Biochemie. Die Plattentechnik hat als Nachteil die lange Analysezeit, die schwierige Vorbereitung der Platten zur Detektion.

Um diese Probleme zu beseitigen, wurde schon bald nach Alternativen gesucht. Da in dünnen Röhren, bedingt durch den kleinen Innendurchmesser, die Konvektionsströme relativ gering sind, wurde versucht, Elektrophorese in solche zu übertragen. Die erste Trennung in einer offenen Röhre wurde von Hjerten (1967) beschrieben. Er ließ die Röhren um die eigene Achse rotieren und konnte dadurch die störenden Konvektionseffekte reduzieren. Im Jahr 1979 begann die eigentliche Entwicklung durch die Reduzierung des Innendurchmessers der Trennkapillare (Mikkers, 1979). Es wurde erstmals eine Kapillare mit 200 μm Innendurchmesser verwendet. Durch die Verwendung von Kapillaren mit 75 μm I.D. wurde die Theorie erstmal erklärt und bessere Resultate erzielt (Jorgenson, 1981a und 1981b). Das günstigere Oberfläche-Volumen-Verhältnis bei den Kapillaren verminderte den störenden Einfluss der thermisch induzierten Konvektion stark. Die ersten kommerziellen erhältlichen Kapillarelektrophoresegeräte erschienen in den Jahren 1988/89 auf dem Markt. Mit den schnellen Fortschritten gewinnt die Kapillarelektrophorese an Popularität als ein alternatives analytisches Werkzeug für einige routinemäßige analytische Anwendung. Diese neue elektrophoretische Technik wird heute als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet.

2.2.2 Geräteaufbau

Eine Kapillarelektrophorese besteht aus einer mit Elektrolytlösung gefüllten Kapillare, zwei Elektrolytgefäßen, einer Hochspannungsquelle und einer Detektionseinheit (**Abbildung 2-3**).

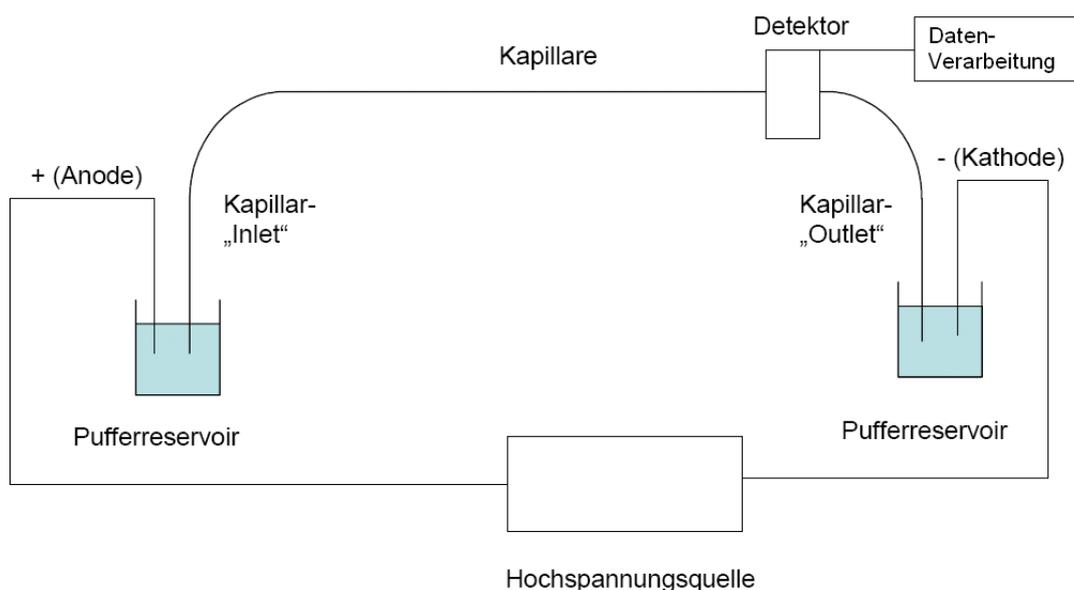


Abb. 2-3: Schematischer Aufbau eines Kapillarelektrophorese-Systems.

Die Trennung findet in einer mit Puffer gefüllten Glaskapillare statt. Zur Durchführung der Kapillarelektrophorese wird eine Kapillare aus amorphem Siliciumdioxid („fused silica“) mit einem üblichen Durchmesser von 25 bis 100 μm und eine Länge von 20-100 cm benötigt. Die Kapillare ist zur Erhöhung ihrer Flexibilität umhüllt mit einer Schicht aus Polyimid. Die Hochspannungsquelle ermöglicht eine stufenlose Spannungseinstellung zwischen 0 und 30 kV. Der resultierende Stromfluß wird mit der Genauigkeit von 1 μA angezeigt. Daneben erlaubt die Meßanordnung elektrophoretische Trennungen bei konstanter Spannung oder konstanter Strömstärke, wobei bei 250 μA das gerätetechnische Maximum erreicht wird. Die zur Trennung anionischer und kationischer Verbindungen notwendige Spannungsumkehr kann durch Umpolung der Hochspannung realisiert werden.

2.2.3 Elektroosmotischer Fluss (EOF)

Der elektroosmotische Fluss ist ein wichtiges Transport-Phänomen, das auf die verwendeten Kapillaren aus amorphem Siliciumdioxid zurückzuführen ist. Die Elektroosmose verursacht einen Fluss der Pufferlösung im elektrischen Feld, wobei der EOF die elektrophoretische Wanderung der Ionen in der Lösung überlagert. Die Kapillaren tragen an der Innen-Oberfläche freie Silanolgruppen, die je nach pH-Wert der angrenzenden Lösung als SiOH_2^+ ($\text{pH} < 2,5$), neutrale SiOH oder SiO^- -Gruppen ($\text{pH} > 2,5$) an der Oberfläche vorliegen. Da bei den meisten Elektrolyten die pH-Werte im Bereich von 4-10 liegen, ist die Kapillaroberfläche negativ geladen, was zur Folge hat, dass bevorzugt Kationen an der Kapillarwand assoziiert werden, um die Oberflächenladung auszugleichen.

Nach der Theorie von *Stern*, bildet sich eine Doppelschicht aus, die eine starre und eine diffuse Schicht einbezieht. Die starre Grenzschicht (*Stern-* oder *Helmholtz-Schicht*) besteht aus Ionen und Lösungsmittelmolekülen, die an der Oberfläche der Kapillare fest adsorbiert sind. Die diffuse Schicht (*Gouy-Chapman-Schicht*) enthält eine positive Überschussladung aus beweglichen Ionen. Die Abnahme des elektrischen Potentials erfolgt in der starren Schicht linear und in der diffusen Schicht exponentiell. Das Potential an der Grenzfläche zwischen starrer und diffuser Schicht ist für die Elektroosmose verantwortlich und wird als elektrokinetisches Zeta-Potential ζ (Volt) bezeichnet (**Abbildung 2-4**).

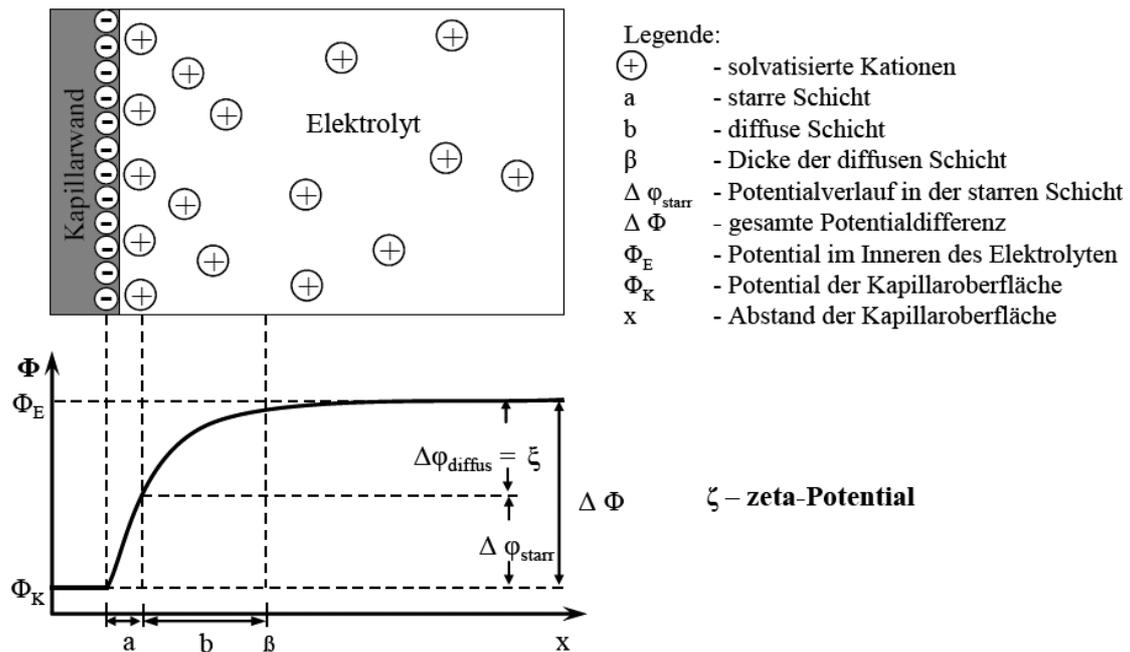


Abb. 2-4: Ursachen des elektroosmotischen Flusses (EOF) – Potentialverlauf durch die elektrische Doppelschicht.

In der **Abbildung 2-5** sieht man einen Vergleich zwischen dem in der Kapillarelektrophorese sehr flachen Flussprofil und dem parabolischen Flussprofil bei den typischen hydrodynamischen Flüssen in der HPLC. Der einheitliche Fluss der Pufferlösung über die gesamte Kapillarlänge zeigt ein kolbenförmiges radiales Strömungsprofil, das im Gegensatz zu einem hydrodynamischen Fluss mit parabolischem Strömungsprofil keinen Einfluss auf die Zonenbreite ausübt und daher nicht zu einer Verschlechterung der Trenneffizienz führt.

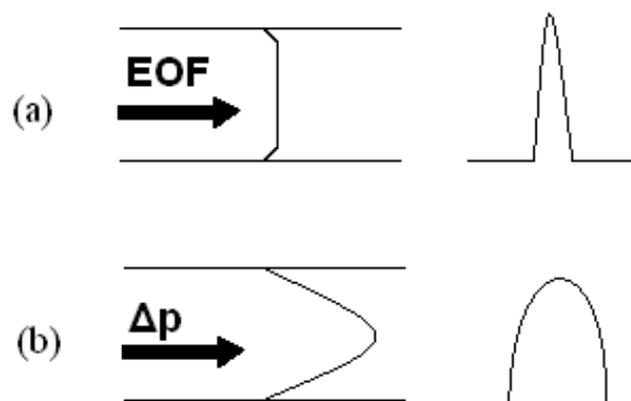


Abb. 2-5: Fließprofil - (a) EOF in der Kapillarelektrophorese und (b) Laminarfluss durch Druckgradient (z.B. HPLC).

Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit des so erzeugten EOF von der angelegten Feldstärke ergibt sich aus der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (**Gleichung 1**):

$$v_{eo} = \frac{\varepsilon \cdot E \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot E \cdot \zeta}{\eta} \quad \text{Gleichung 1}$$

- v_{eo} elektroosmotische Strömungsgeschwindigkeit
- ε absolute Dielektrizitätskonstante ($\varepsilon = 4\pi \cdot \varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r$)
- ε_0 elektrische Feldkonstante im Vakuum ($8,85 \cdot 10^{-12} \text{ J}^1 \cdot \text{C}^2 \cdot \text{m}^{-1}$)
- ε_r Dielektrizitätskonstante (H_2O bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$)
- E elektrische Feldstärke

Aus der **Gleichung 1** ergibt sich daher für die elektroosmotische Mobilität μ_{eo} :

$$\mu_{eo} = \frac{v_{eo}}{E} = \frac{\varepsilon \cdot \zeta}{4\pi \cdot \eta} = \frac{\varepsilon_0 \cdot \varepsilon_r \cdot \zeta}{\eta} \quad \text{Gleichung 2}$$

Die Höhe des Zeta-Potentials wird von zahlreichen experimentellen Parametern geprägt, die zur Beeinflussung des EOF verwendet werden können. Zur Modifizierung, Unterdrückung oder Umkehrung des EOF werden verschiedene Verfahren eingesetzt, zum einen beispielsweise die Verwendung von Kapillarwandbelegungsreagenzien, zum anderen die Änderung des Deprotonierungsgrades der Kapillaroberfläche. Bei Quarzglas Kapillaren sinkt die Geschwindigkeit des EOF mit steigender Ionenstärke durch die damit verbundene Verkleinerung des Zeta-Potential, wächst jedoch mit dem Dissoziationsgrad der Oberflächensilanolgruppen, d. h. mit steigendem pH-Wert.

2.2.4 Elektrophoretische Mobilität

Die elektrophoretische Mobilität (μ_{ep}) bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit des Analyten im elektrischen Feld und ist für die Trennung entscheidend, da sie substanzspezifisch ist. Es handelt sich dabei um eine Konstante, die außer von den Eigenschaften des Ions von denen des Puffersystems abhängig ist. Die

Migrationsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens (v_{ep}) in einem Elektrolytpuffer ist eine Funktion der angelegten elektrischen Feldstärke (E), seiner Eigenladung (q) sowie dem Reibungswiderstand, den das betrachtete Teilchen in der Pufferlösung erfährt. Diese Beziehung lässt sich durch **Gleichung 3** ausdrücken, wobei r den Radius des Teilchens sowie η die Viskosität des Puffers darstellt:

$$v_{ep} = \frac{q \cdot E}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \text{ (cm s}^{-1}\text{)} \quad \textbf{Gleichung 3}$$

Bei konstanter Feldstärke und definierter Pufferzusammensetzung ist die Migrationsgeschwindigkeit nur noch eine Funktion von Ladung, Größe und Gestalt der Teilchen. Um die Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener ionischer Analyten miteinander vergleichen zu können, werden diese auf eine einheitliche Feldstärke von 1 Vcm^{-1} bezogen. Der Quotient aus Geschwindigkeit und Feldstärke stellt die elektrophoretische Mobilität μ_{ep} dar:

$$\mu_{ep} = \frac{v_{ep}}{E} \text{ (cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)} \quad \textbf{Gleichung 4}$$

Die Migrationsgeschwindigkeit hängt außer von den in **Gleichung 3** angesprochenen Faktoren noch von der Temperatur, dem pH-Wert und der Ionenstärke des Puffers ab. Nicht nur aus diesen Gründen gibt **Gleichung 3** trotz prinzipieller Gültigkeit die wirklichen Verhältnisse nur angenähert wieder. Der Temperatur kommt, aufgrund ihrer Einflussnahme auf alle am elektrophoretischen Transport zugrundeliegenden Faktoren, größte Bedeutung zu. In stromdurchflossenen Elektrolyten geht ein Teil der elektrischen Energie in Form der Jouleschen Wärme verloren und bewirkt die Aufheizung des Trennmediums. Zur Aufrechterhaltung konstanter Meßbedingungen muss eine wirksame Wärmeabfuhr gewährleistet sein. Die Temperierung bzw. Kühlung dient gleichermaßen zur Reduzierung konvektiver Pufferströme, welche die Effizienz von Stofftrennung durch Peakverbreiterung mindern.

Für die Migrationsgeschwindigkeit schwacher Säuren, Basen sowie Ampholyten ist der pH-Wert des Puffers entscheidend, da deren Ionisierung vom Dissoziationsgrad abhängt. Neutralverbindungen ($q = 0$) weisen keine elektrophoretische Mobilität auf. Um eine schnelle

elektrophoretische Trennung zweier Komponenten zu erzielen, sollte das Medium einen pH-Wert aufweisen, der zwischen den pK_a -Werten der Analyten liegt. Bei einer gegebenen Ladung (q), wird die Migration eines Analyten von seiner Größe bzw. Masse bestimmt. In dem Ausmaß wie diese zunimmt, verringert sich die Geschwindigkeit (Neubert, 2003).

Die Einflussnahme der Ionenstärke auf die Migrationsgeschwindigkeit eines geladenen Teilchens wird durch die *Debye-Hückel-Onsager*-Theorie beschrieben. Danach umgibt ein wanderndes Zentralteilchen eine unsymmetrische Hydrat- und Ionenatmosphäre, die Pufferionen umgekehrten Vorzeichens enthält. Die Ausmaße der Hülle wachsen mit zunehmender Ionenstärke. Die Migrationsgeschwindigkeit des Zentralions wird infolge einer unsymmetrischen Ladungsverteilung in der Ionenwolke, seiner reduzierten effektiven Ladung (q_{eff}) sowie dem aufgeweiteten Radius (r_{eff}) abgebremst (Ohlenschläger, 1980).

Experimentell lässt sich die Mobilität eines Analyten unter gegebenen Bedingungen auf der Grundlage der Migrationszeit bestimmen. In der Kapillarelektrophorese ist die Migrationszeit definiert als die Zeit, die ein gelöster Analyt benötigt, um die Trennstrecke vom Ort der Injektion bis zum Detektionspunkt zu durchwandern. Danach ergibt sich die Mobilität (μ) unter den gegebenen Bedingungen zu:

$$\mu = \frac{v_{ep}}{E} = \frac{\frac{L_d}{t_m}}{\frac{V}{L_t}} = \frac{L_d \cdot L_t}{t_m \cdot V} \text{ (cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}\text{)} \quad \text{Gleichung 5}$$

Dabei stellt E das elektrische Feld, L_d die Länge der Kapillare bis Detektor, L_t die Gesamtlänge der Kapillare, t_m die Migrationszeit sowie V die angelegte Spannung dar.

2.2.5 Injektion in der Kapillarelektrophorese

Voraussetzung für eine effektive Analysetechnik ist eine quantitative und reproduzierbare Probenaufgabe. Bei dem Gesamtvolumen der Kapillare im Bereich von wenigen μL darf das Injektionsvolumen nur einige nL betragen. Das Volumen der Injektion muss zwischen 0,5 und 50 nL liegen. In den heutzutage verfügbaren Systemen, wird elektrokinetische, hydrodynamische oder hydrostatische Injektion verwendet.

Hydrostatische Injektion

Bei dieser Injektion wird durch das Anheben des Probengefäßes eine kontrollierte Druckdifferenz durch die Schwerkraft erzeugt. Durch die unterschiedliche Höhe der Flüssigkeitsspiegel in den Behältern am Ein- und Austrittsende der Kapillare entsteht ein Siphoneffekt, der die Probenlösung in die Trennkapillare saugt. Nachteilig bei der Höhendifferenz-Injektion ist, dass während der Zeit, in der das Probengefäß angehoben und wieder abgesenkt wird, ein Teil der Probe in die Kapillare fließt. Bei kurzen Injektionszeiten (1 s bis 5 s) ist dieser Effekt nicht vernachlässigbar.

Hydrodynamische Injektion

Die Probeaufnahme erfolgt durch Anlegen einer Druckdifferenz. Diese wird im vorliegenden Fall durch einen Überdruck auf der Probenseite oder ein Vakuum auf der Detektionsseite erzeugt. Das injizierte Volumen (V) wird nach der *Hagen-Poiseuille*-Gleichung (**Gleichung 6**) berechnet:

$$V = \frac{\Delta p \cdot d^4 \cdot \pi \cdot t}{128 \cdot \eta \cdot L_t} \quad \text{Gleichung 6}$$

wobei Δp Druckdifferenz über die Kapillare (Pa), d Innendurchmesser der Kapillare (m), t Injektionszeit (s), η Pufferviskosität (Pas) und L_t Gesamtlänge der Kapillare (m) ist. Bei größeren Innendurchmessern (ungefähr 100 μm I.D.) muss die Injektionszeit entsprechend gering gewählt werden, um das Volumen klein zu halten, wodurch sich die Reproduzierbarkeit verschlechtert. Nachteilig bei der Vakuumtechnik ist zum einen, dass nur ein begrenztes Druckdifferential erzeugt werden kann, zum anderen können sich durch das Vakuum Blasen in der Kapillare bilden.

Elektrokinetische Injektion

Hier wird nach dem Eintauchen der Kapillare in das Probengefäß ein definiertes elektrisches Feld angelegt, durch die geladene Analytmoleküle in die Kapillare migrieren können. Die Probe wandert sowohl durch elektrophoretische Migration als auch durch den elektroosmotischen Fluss (EOF) in die Trennkapillare. Somit ist die aufzugebene

Probenmenge sowohl von der Höhe der angelegten Spannung und der Zeit, in der die Spannung anliegt, als auch von der Mobilität der Ladungsträger abhängig. Dies führt zur Diskriminierung der geladenen Probenkomponenten, falls sich diese in ihrer Mobilität unterscheiden. Die Diskriminierung bringt sowohl Vorteile als auch Nachteile mit sich. Negativ sind die damit verbundene geringere Reproduzierbarkeit und der Verlust der Quantifizierbarkeit. Zusätzlich machen sich Variationen der Leitfähigkeit der Probelösung bemerkbar. Bei hohen Widerständen des Analyten ist die Mobilität der verschiedenen Ionen entscheidend und es kommt zur Anreicherung der Probenkomponenten mit großer Beweglichkeit. Hingegen verliert bei guter Leitfähigkeit der Probelösung und vorhandenem elektroosmotischem Fluss die elektroosmotische Wanderung an Bedeutung und die Ionen werden hauptsächlich durch den Transport der Probelösung injiziert. Positiv ist jedoch die Möglichkeit, besonders bewegliche Ionen anzureichern und damit die Nachweisgrenze zu verbessern. Darüber hinaus benötigt die elektrokinetische Injektion keine zusätzlichen Apparaturen und funktioniert selbst bei viskosen Medien oder Gelen (Krivacsy, 1999). Die injizierte Menge Q errechnet sich aus:

$$Q = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{eo}) \cdot U \cdot \pi \cdot r^2 \cdot c \cdot t_i}{L_{ges}} \quad \text{Gleichung 7}$$

wobei μ_{ep} die elektrophoretische Mobilität der Probe, μ_{eo} Mobilität des EOF, U die angelegte Spannung, c die Konzentration der Probe, t_i die Injektionszeit und L_{ges} die Gesamtlänge der Kapillare ist.

Hydrostatische und Hydrodynamische Injektionen sind die Methoden, die in der vorliegenden Arbeit benutzt wurden.

2.2.6 Detektoren

Die Detektion in der CE stellt eine besondere Herausforderung dar, bedingt durch die kleinen Dimensionen der Kapillaren und den damit verbundenen geringen Probenmengen. Die meisten Detektionsmethoden sind denen der HPLC sehr ähnlich. Wie in der HPLC ist die UV-Vis-Detektion die meist verwendete.

UV-Vis-Detektion

Die Detektion basiert auf der Absorption eines Lichtes im ultravioletten oder sichtbaren Bereich (UV-Vis) „on-capillary“. Ein Licht mit einer bestimmten Wellenlänge und Intensität I_0 wird durch ein Fenster in der Kapillare (**Abbildung 2-6**) gestrahlt. Die Probe absorbiert einen Teil des gestrahlten Lichtes und der restliche Teil, mit Intensität I , wird durch eine Photodiode detektiert. Die Absorption A ist durch das *Lambert-Beersche* Gesetz definiert:

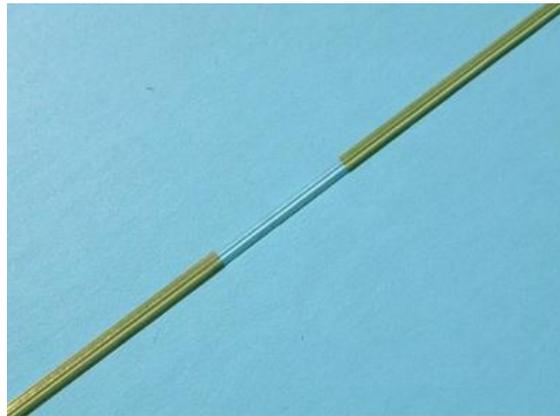


Abb. 2-6: Ein von der äußeren Polyimid-Beschichtung befreites Fenster in der Kapillare.

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad \text{Gleichung 8}$$

wobei I_0 die Anfangsintensität des Lichtes, I die durchgelassene Intensität, ε der molare Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$), c die Konzentration der Probe und d der Lichtweg in der Probe ist. Das *Lambert-Beersche* Gesetz ist nur für verdünnte Lösung gültig, weil der molare Extinktionskoeffizient ε einer Substanz bei einer Wellenlänge nur bei tiefen Konzentrationen konzentrationsunabhängig ist. Die strikte Einhaltung dieses Gesetzes wird auch nur mit monochromatischem Licht beobachtet.

Die kurze Weglänge des Lichtes durch die Kapillare limitiert die Empfindlichkeit in der CE. Der Lichtstrahl muss senkrecht in die Kapillare eingestrahlt werden und fokussiert sein, um die maximale Lichtausbeute zu erhalten und das Streulicht zu minimieren. In den meisten kommerziellen Geräten werden entweder Linsensysteme oder Spalten verwendet, um den Lichtstrahl zu fokussieren und es werden Kapillaren ab einem Innendurchmesser von mindestens $50 \mu\text{m}$ verwendet.

Als Lichtquelle werden im UV-Vis-Bereich entweder kontinuierliche Strahler oder Linienstrahler eingesetzt. Kontinuierliche Strahler benötigen auch noch einen Interferenzfilter oder einen Monochromator, der das weiße Licht im Spektralbereich spaltet, um eine bestimmte Wellenlänge zu wählen. Die Interferenzfilter haben normalerweise eine spektrale Bandbreite von 10 bis 15 nm, d. h. kein reines monochromatisches Licht. In diesem Fall muss die Absorption am Absorptionsmaximum des Analyten gemessen werden, um die Abweichung des Gesetzes so klein wie möglich zu halten. Als kontinuierliche Strahler werden Deuteriumlampen (190-400 nm), Halogenlampen (400-800 nm) oder Xenonlampen (250-700 nm) eingesetzt (Böcker, 1997). Als Einwellenlängenlichtquellen werden Quecksilberdampflampen (185 nm und 254 nm) oder Zinklampen (214 nm) eingesetzt. Die Lichtmenge kann bei diesen Lampen um das 50fache höher liegen als bei den sonst üblichen Deuteriumlampen. Darüber hinaus treten dann keine Verluste durch den Monochromator (durch Beugung am Gitter) oder den Interferenz auf (Engelhardt, 1994). Seit einiger Zeit werden Leuchtdioden (LED), die einen geringeren Energieverbrauch haben und kleiner und robuster sind als die oben genannten Lampen, als Lichtquellen verwendet (Dasgupta, 1993; Hauser, 1995; Macka, 1996; Butler, 1997; Hauser, 1997; Lu, 2001; King, 2002;).

Als Empfänger dienen entweder Photodioden oder Photomultiplier. Die teuersten und empfindlichsten Photomultiplier sind Vakuumphotozellen, die über Dynoden (10-14) kaskadenförmig die Elektronen verstärken, die durch die Photonen wegen des Photoeffektes aus der Photokathode entfernt werden. Ihre Anzahl ist in einem weiten Bereich proportional zur Anzahl der auftreffenden Photonen. Diese vervielfachte Anzahl von Elektronen erzeugt an der Anode ein Signal. Die Photomultiplier sind für die Messung von schwächsten Lichtimpulsen hervorragend geeignet. Sie sind wegen des geringen Grundrauschens, der hohen Verstärkung und wegen des großen Linearitätsbereichs die geeignetsten und meistverwendeten Detektoren für spektraloptische Analysengeräte und Lichtmessgeräte (Böcker, 1997).

Fluorimetrische Detektion

Eine andere Möglichkeit zur Detektion in der Kapillare stellt die fluorimetrische Detektion dar. Die Fluoreszenzeigenschaften von einigen Molekülen, die in der Regel mehrere

konjugierte Doppelbindungen oder aromatische Gruppen (Fluorophor-Gruppe) enthalten, können zur fluorimetrischen Detektion verwendet werden. Die fluoreszierenden Moleküle absorbieren Licht einer gewissen Wellenlänge und reemittieren in sehr kurzer Zeit Licht mit geringerer Energie, d. h. größerer Wellenlänge. Grundsätzlich ist der fluorimetrische Detektor dem UV-Vis-Detektor ähnlich, nur dass die resultierende Fluoreszenzstrahlung mit einem Winkel von 90° gemessen wird. Fluoreszenz entsteht über einen Prozess mit mehreren Schritten, welcher vor allem bei Polyaromaten und Heterocyclen stattfindet. Das Diagramm in **Abbildung 2-7** stellt diesen Prozess schematisch dar.

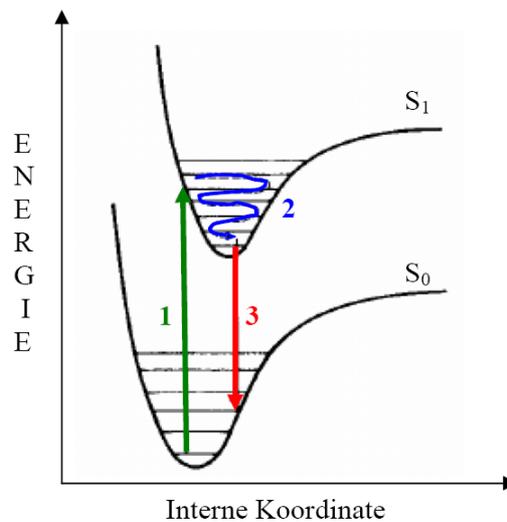


Abb. 2-7: Darstellung der einzelnen Schritte Anregung (1), Schwingung (2) und Emission (3) eines Fluorophoren.

In der **Abbildung 2-7** sind die Schwingungsniveaus des elektronischen Grundzustandes S_0 und die des ersten elektronisch angeregten Zustandes S_1 dargestellt. Der Abstand zwischen den Atomen eines Moleküls im Grundzustand ist kleiner als im angeregten Zustand. Dies ist in der Abbildung dadurch gekennzeichnet, dass das Maximum der oberen Kurve S_1 im Koordinatensystem nach rechts verschoben ist.

Der erste Schritt bei der Fluoreszenz ist die Anregung der Farbstoffmoleküle durch die Bestrahlung mit einer externen Quelle. Diese Anregung nennt man Absorption. Sie läuft in der Weise ab, dass ein Elektron aus einem bindenden π -Orbital in den Aromaten des Farbstoffes in ein antibindendes π^* -Orbital angehoben wird. Nach dem *Franck-Condon* Prinzip ändert sich der Kernabstand während des Elektronensprungs nicht. In der Darstellung bedeutet dies, dass der elektronische Übergänge „*vertikal*“ stattfinden, d. h. ein Elektron, das

aus dem untersten Schwingungsniveau von S_0 nach S_1 angeregt wird, „landet“ in S_1 nicht im untersten Schwingungsniveau, sondern auf einem höheren. Im zweiten Schritt relaxiert das Molekül in den untersten Schwingungszustand des elektronisch angeregten Zustandes S_1 . Von diesem kehrt es dann im dritten Schritt unter Emission eines Photons wieder in den Grundzustand S_0 zurück. Auch dies geschieht wiederum nach dem *Franck-Condon* Prinzip. Das Elektron gelangt deshalb meist in ein etwas angehobenes Schwingungsniveau aus S_0 und relaxiert von dort in das unterste Schwingungsniveau (in der **Abbildung 2-7** nicht eingezeichnet). Die Folge ist, dass das Fluoreszenzlicht energieärmer ist als das Licht, mit dem angeregt wurde. Demnach besitzen die emittierten Photonen eine größere Wellenlänge. Es gelangen jedoch nicht alle angeregten Moleküle über den „Umweg“ des Schrittes (2) in den Grundzustand zurück, sondern sie geben ihre Energie teilweise an ihre Umgebung ab, ohne dabei zu fluoreszieren.

Ein guter Fluorophor zeichnet sich durch eine starke Absorption des eingestrahnten Lichts aus. Angegeben wird diese Eigenschaft durch den molaren Extinktionskoeffizienten ϵ . Des Weiteren ist eine hohe Quantenausbeute $\Phi > 0,7$ erstrebenswert. Die Quantenausbeute ist das Verhältnis zwischen der Anzahl der emittierten und der Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeiteinheit.

$$\Phi = \frac{n_{em}}{n_{ab}} \quad \text{Gleichung 9}$$

Wobei n_{em} die Anzahl der emittierten Photonen und n_{ab} die Anzahl der absorbierten Photonen ist. Die Quantenausbeute reagiert empfindlich auf die Umgebung der Fluorophoren. Sie ändern sich z.B. mit dem pH-Wert oder der Temperatur des Lösungsmittels und können auch durch diese Anbindung stark beeinflusst werden (Gassmann, 1985).

Die fluorimetrische Detektion kann auf niedermolekulare Verbindungen, die keine eigene Fluoreszenz haben, erweitert werden. Zu diesem Zweck wird in den Analyten durch einen Derivatisierungsschritt eine Fluorophor-Gruppe eingeführt. Dabei treten jedoch Nachteile wie größerer Zeitaufwand sowie teure Derivatisierungsreagenzien auf. Zu weiteren Schwierigkeiten zählen vor allem die Abhängigkeit der Umsatzrate von der Zusammensetzung der Probenmatrix und das Auftreten von Reagenzpeaks, die sich mit den Peaks der Analyte überlagern können.

Amperometrie

Die amperometrische Detektion basiert auf der Anlegung eines konstanten Potentials an eine Elektrode. Elektroaktive Analyte erhalten (Reduktion) oder verlieren (Oxidation) Elektronen an der Elektrode und der resultierende Strom hängt von der Konzentration des Analyten in der Lösung ab.

Da es sich bei der elektrochemischen Detektion grundsätzlich um eine Oberflächenreaktion (Reduktion bzw. Oxidation des Analyten auf der Elektrodenoberfläche) handelt, kann die Adsorption verschiedener Probenbestandteile im Laufe eines Meßtages zur Inaktivierung der Elektrodenoberfläche führen, woraus sich eine abnehmende Nachweisempfindlichkeit ergibt. Die Deaktivierung der Elektrodenoberfläche lässt sich vermeiden, wenn wir anstelle der konstanten Spannung eine sich mit bestimmter Frequenz wiederholende Sequenz von unterschiedlichen Spannungspulsen an die Elektrode anlegen. Beispielsweise können wir einem Meßintervall bei der Spannung E_1 , ein oxidatives Reinigungsintervall bei einer erhöhten Spannung E_2 sowie ein reduktives Reaktivierungsintervall bei einer erniedrigten Spannung E_3 folgen lassen, an welches sich das nächste Meßintervall anschließt (**Abbildung 2-8a**). Durch Anlegen eines weiteren positiveren und negativeren Potentials können oxidierbare und reduzierbare Reaktionsprodukte von der Elektrodenoberfläche entfernt werden. Eine geeignete Spannungsfunktion für die gepulste elektrochemische Detektion (PAD) an der Goldelektrode ergibt sich unmittelbar aus dem zyklischen Voltammogramm des Elektrodenmaterials.

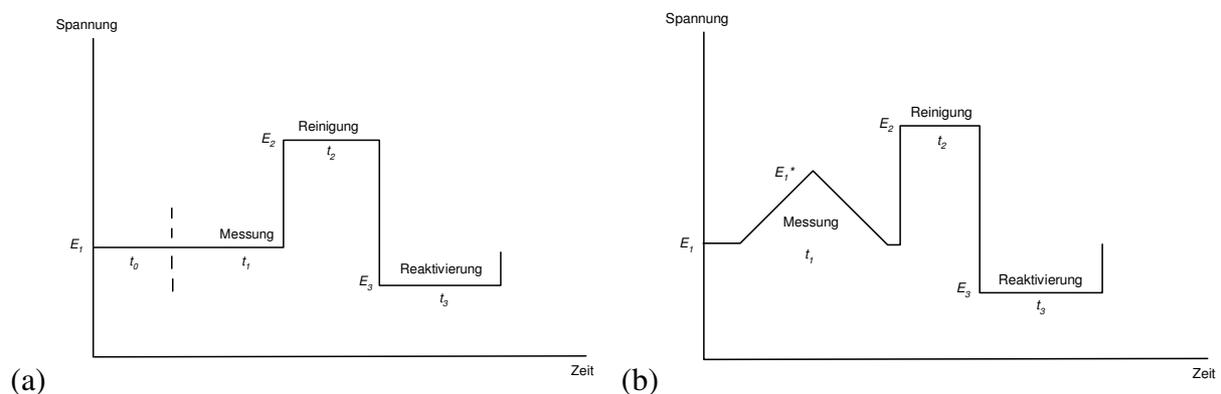


Abb. 2-8: Typische Spannungs-Zeit-Funktionen für (a) die gepulste amperometrische Detektion (PAD) und (b) die integrierende gepulste amperometrische Detektion (IPAD).

Die integrierende gepulste Amperometrie ist eine erweiterte Anwendungsform der PAD. Sie beinhaltet nicht nur drei, sondern mehr Potentialsniveaus, die bei der Detektion unterschiedliche Funktionen besitzen können (**Abbildung 2-8b**). Die Spannung E_I wird so gewählt, dass sie einer praktisch oxidfreien Elektrode entspricht. Anschließend wird die Spannung linear von E_I auf E_I^* und wieder zurück auf E_I geändert und dabei der Strom integrierend gemessen. E_I^* entspricht einer mit AuO bedeckten Elektrode. Bei Abwesenheit eines Analyten ist das gemessene integrierte Stromsignal etwa Null, da die Ladungsmenge (mit umgekehrtem Vorzeichen) für die Reduktion ist. Die Anwesenheit eines Analyten erhöht wegen der irreversiblen Oxidation praktisch nur die Ladungsmenge bei der größer Null. Generell hat die Amperometrie eine gute Nachweisgrenze, aber sie ist nur für elektroaktive Analyte verwendbar. Als Elektrodenmaterialien kommen glasartiger Kohlenstoff, Kohlepaste, Quecksilber, Platin, Gold, Metalloxide, chemisch modifizierte Kohleelektroden sowie mit Enzymen modifizierte Elektroden zum Einsatz. Amperometrische Detektoren mit Mikroelektroden eignen sich besonders gut für kapillarelektrophoretische Trennverfahren, da sie weitgehend kompatibel mit dem extrem kleinen Volumina dieser Trenntechnik sind.

2.2.7 Formen der Kapillarelektrophorese

Unter dem Obergriff „Kapillarelektrophorese“ werden verschiedene Trenntechniken zusammengefasst. Kapillarzonenelektrophorese (CZE) ist eines der zur Zeit am häufigsten eingesetzten Verfahren, bei der die Trennung der Probe in Kapillaren mit homogen zusammengesetztem Elektrolyt durchgeführt wird. Grundlage ist die Mobilitätsdifferenz der einzelnen ionischen Analyten. Die Kapillargelelektrophorese (CGE) ist zur Trennung von Makromolekülen geeignet. Die Kapillaren sind hier mit einem Gel oder einer Polymerlösung gefüllt, die die Migration der geladenen Makromoleküle je nach ihrer Größe behindert. Andere elektrophoretische Verfahren sind die Mizellare elektrokinetische Kapillarchromatographie (MEKC), die mit den auch ungeladenen Molekülen getrennt werden können, die Isotachophorese (ITP) und die isoelektrische Fokussierung (IEF).

Kapillarzonenelektrophorese (CZE)

Kapillarzonenelektrophorese wird auch umgangssprachlich als Kapillarelektrophorese (CE) bezeichnet. Wegen der einfachen Handhabung und Vielseitigkeit ist die CZE die meistgenutzte Methode. Die CZE ist die einfachste Form der CE, da die Kapillare nur mit

Pufferlösung gefüllt ist. Die Trennung erfolgt durch die Migration in definierten Zonen mit verschiedenen Geschwindigkeiten (Engelhardt, 1994).

Das Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese ist in **Abbildung 2-9** schematisch dargestellt. Die Analyten (A) einer schmalen Probenzone ($t = 0$) wandern im elektrischen Feld unabhängig voneinander mit einer ihrer elektrophoretischen Mobilität ($\mu_1 > \mu_2 > \mu_3$) entsprechenden Geschwindigkeit. Es bilden sich diskrete Analyt-Zonen ($t > 0$), die zum Detektionspunkt wandern.

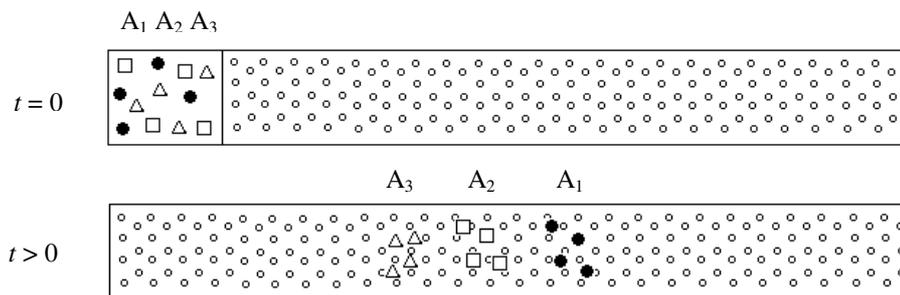


Abb. 2-9: Prinzip der Kapillarzonenelektrophorese (CZE).

Wegen des in unbehandelten Fused-Silica-Kapillaren immer kathodisch ausgerichteten EOF erfolgt die Probenaufgabe üblicherweise auf der Seite der Anode, während die Detektion nahe der Kathode vorgenommen wird. Die Beschreibung eines Trennergebnisses in der CE erfolgt analog der Chromatographie durch die Bestimmung des Trennfaktors, der Peakauflösung und der Effizienz bzw. Trennstufenzahl aus den erhaltenen Elektropherogrammen.

Der Trennfaktor α_a (auch α -Wert) beschreibt die Selektivität einer Stofftrennung hinsichtlich der unterschiedlichen Mobilitäten, die zwei geladene Analyten (1 und 2) unter der gegebenen Bedingung aufweisen. Er ist definiert als Quotient aus der höheren Mobilität (μ_{a1}) des schnell und der niedrigeren Mobilität (μ_{a2}) des langsam wandernden Analyten:

$$\alpha_a = \frac{\mu_{a1}}{\mu_{a2}} = \frac{t_{a2}}{t_{a1}} \quad \text{Gleichung 10}$$

Wobei t_{a1} und t_{a2} die Migrationszeit der Analyten sind. Da dem α -Wert keine Aussagen zur Qualität von Trennungen, wie partielle oder vollständige Peakauflösung, zu entnehmen ist, kommt der Ermittlung der Peakauflösung (R_s) größere Bedeutung zu:

$$R_s = \frac{2(t_{a2} - t_{a1})}{(w_{a1} + w_{a2})} \quad \text{Gleichung 11}$$

Neben den Migrationszeiten gehen in die Auflösung zusätzlich Informationen zu den Peakbasisbreiten (w_{a1}) und (w_{a2}) zweier Analyten ein. Eine große Peakbasisbreite kann als Indiz für schlechte Trennbedingungen gewertet werden. Die Effizienz von CE-Trennungen kann ebenso analog der Chromatographie durch die Zahl theoretischer Trennstufen (N) wiedergegeben werden:

$$N = 16 \left(\frac{t_a}{w_a} \right)^2 \quad \text{Gleichung 12}$$

Mizellare elektrophoretische Kapillarchromatographie (MEKC)

Die mizellare elektrophoretische Kapillarchromatographie, die im Jahre 1984 von Terabe (1984) eingeführt wurde, stellt eine Erweiterung der elektrophoretischen Trenntechniken auf ungeladener Analyte dar.

Diese Technik kann sowohl neutrale Moleküle als auch geladene Teilchen trennen. Dazu erforderlich ist nur der Zusatz geladener Tenside zum Elektrolytpuffer. Die neutralen Moleküle verteilen sich zwischen dem Puffer und den Mizellen nach ihrer Hydrophobie (Engelhardt, 1994; Pyell, 2001; Molina, 2002). Die Trennung der ungeladenen Analyte erfolgt durch polaritätsabhängige Verteilung zwischen einer polaren wässrigen Phase und einer unpolaren pseudostationären Phase (**Abbildung 2-10**).

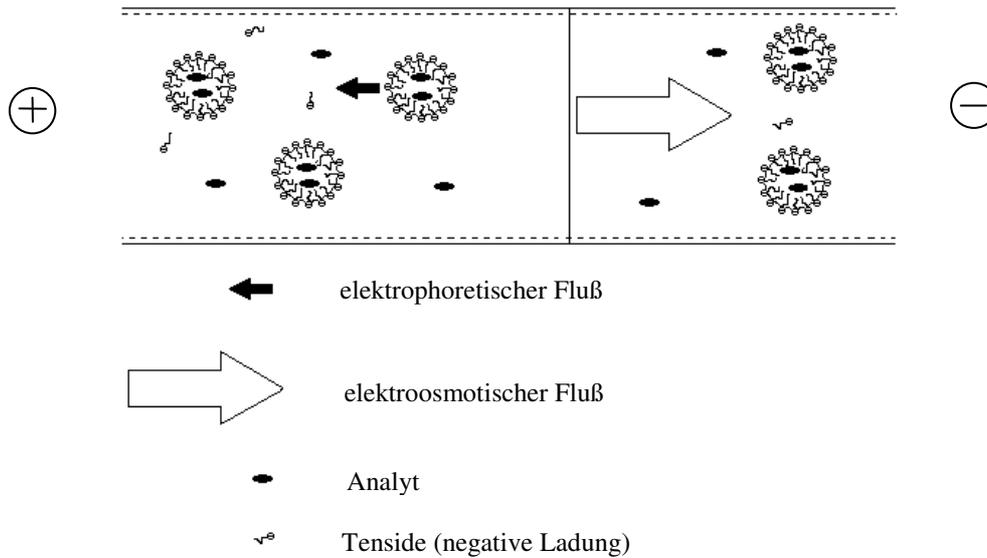


Abb. 2-10: Schematische Darstellung der Trennung in der MEKC (Engelhardt, 1994)

Die Mizellen bilden im Puffer mit ihrem ausgeprägten lipophilen Innenraum eine Phase, die in ihren Eigenschaften mit einer stationären Phase aus der HPLC vergleichbar ist. Aufgrund ihrer Eigenbeweglichkeit im elektrischen Feld wird sie als pseudo-stationäre Phase bezeichnet. Wie in der CZE ergibt sich die effektive Wanderungsgeschwindigkeit der Analytmoleküle sowie der Mizellen aus der vektoriellen Summe der elektrophoretischen Wanderung und der elektroosmotischen Geschwindigkeit. Die elektrophoretische Mobilität ist gering, sodass bei Überlagerung mit dem elektroosmotischen Fluss eine Nettobewegung in Richtung der Kathode resultiert.

Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Auf Basis des isoelektrischen Punktes (pI-Wert) wird IEF für die Trennung von Peptiden und Proteinen (amphotere Substanzen) verwendet. Die Trennung erfolgt in einem pH-Gradienten, der sich durch Zusatz von Ampholyten zum Puffer im elektrischen Feld ausbildet (**Abbildung 2-11**). Durch das angelegte elektrische Feld wandern die geladenen Ampholyte und Proteine durch das Medium, bis sie die Zone mit dem pH-Wert erreichen, wo sie ungeladen sind. Sobald der Gleichgewichtszustand erreicht ist, fließt kein Strom mehr und die getrennten Proteine werden durch Druck zum Detektor transportiert (Strege, 1991; Engelhardt, 1994).

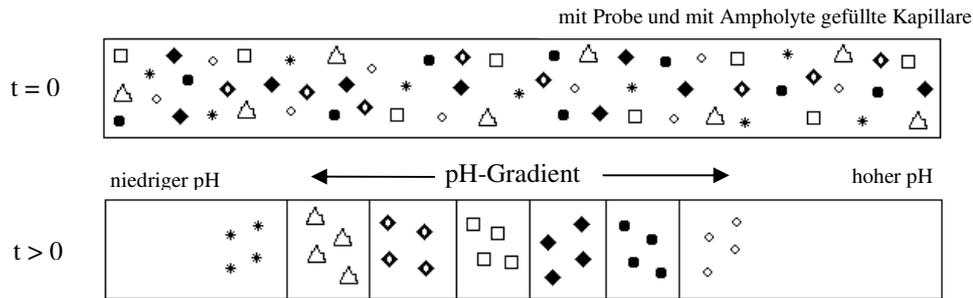


Abb. 2-11: Schematische Darstellung der IEF (Cammann, 2001).

Der pH-Gradient wird in der Kapillare durch eine Ampholytmischung erzeugt, welche eine Reihe von pI-Werten zwischen einem niedrigen und einem hohen pH-Wert und eine gute Pufferfunktion aufweist. Die Pufferfunktion wird durch amphotere Substanzen, wie z. B. Aminocarbonsäuren mit unterschiedlichen Verhältnissen an Amino- und Carboxylgruppen erreicht. Je nach Art der verwendeten Ampholyte können unterschiedlich große pH-Wert-Bereiche abgedeckt und der pH-Gradient so dem Trennproblem angepasst werden. Nach der angelegten Spannung ordnen sich die Ampholyte aufgrund des Protonen- und Hydroxidioneneinflusses entsprechend ihrer pI-Werte an, und es bildet sich ein stabiler pH-Gradient über die gesamte Trennstrecke aus.

Isotachophorese (ITP)

Im Gegensatz zur Kapillarelektrophorese wird ITP als ein diskontinuierliches Elektrolytensystem (Puffer 1 enthält ein Leitend (L), z. B. Chlorid, mit hoher Beweglichkeit, und Puffer 2, ein Folgend (T), z. B. Glycin, mit niedriger Beweglichkeit) verwendet. Nach der Einstellung eines stationären Zustands bilden sich Zonen aus, die alle mit der gleichen Geschwindigkeit wandern. Die Zonen, die eine einzelne Komponente enthalten, befinden sich sandwichartig zwischen dem vorlaufenden und dem abschließenden Elektrolyten (**Abbildung 2-12**). Man erhält nur ein Stufendiagramm und keine Peaks (Engelhardt, 1994; Blatny, 1999; Gebauer, 2000, Gebauer, 2002).

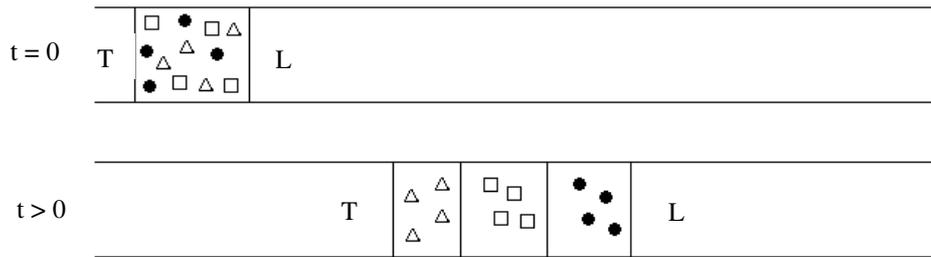


Abb. 2-12: Schematische Darstellung der ITP (Cammann, 2001).

Die ITP wurde früher für die Trennung anorganischer Ionen und organischer Carbonsäuren verwendet, da es aber Schwierigkeiten gab, geeignete Elektrolyte zu finden und auch Detektionsprobleme auftauchten, hat sich die ITP nicht weiter durchgesetzt.

In dieser Dissertation wurden als Trennmethode die Kapillarzonenelektrophorese (CZE), die im Folgenden als Kapillarelektrophorese (CE) genannt wird, und die mizellare elektrophoretische Kapillarchromatographie (MEKC) verwendet.

2.3 HAUT

2.3.1 Aufbau der humanen Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und stellt als äußere Körperbedeckung sowohl eine schützende Grenzfläche als auch eine breite Kontaktfläche zur Außenwelt dar. Sie ist in erster Linie ein Schutzorgan gegenüber mechanischen, thermischen, chemischen und biologischen Einflüssen (Liebich, 1999). Die Körpertemperatur und der Wasserhaushalt werden u.a. über Hautdrüsen und -blutgefäße reguliert; weiter fungiert die Haut als Sinnesorgan, welches zur Wahrnehmung von mechanischen, thermischen und Schmerzreizen dient (Leonhardt, 1990). Makroskopisch lassen sich bei Haut die Epidermis (Oberhaut), die zusammen mit der Dermis (Lederhaut, Korium) die Kutis bildet, und die Subkutis (Unterhaut, Hypodermis) unterscheiden (**Abbildung 2-13**).

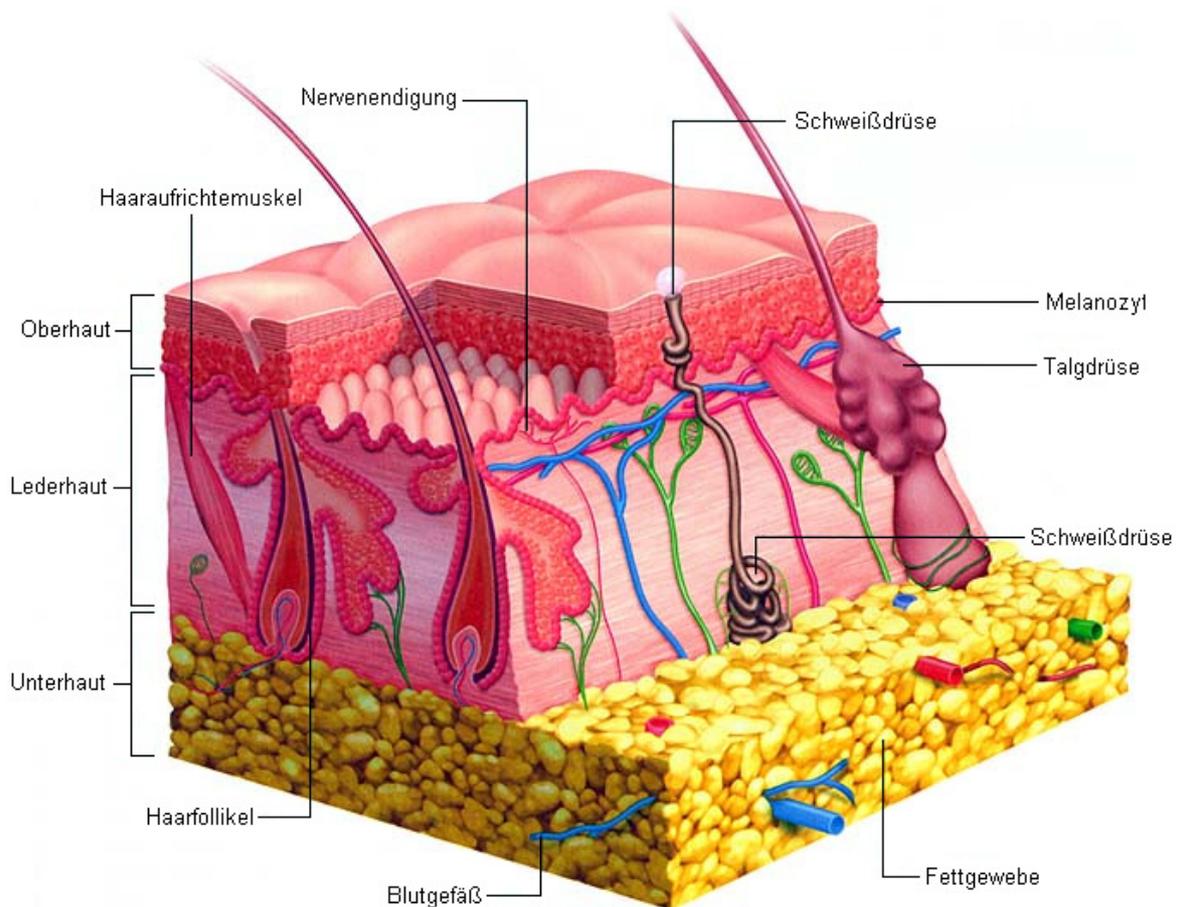


Abb. 2-13: Schematischer Aufbau der Haut.

Epidermis

Die Epidermis, deren Dicke ungefähr 0,1 mm (abhängig von der Körperregion von 0,05 mm bis zu 1,4 mm) beträgt, besteht aus vier Schichten: dem *Stratum corneum* (SC, Hornschicht), *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht), *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht) und dem *Stratum basale* (Basalzellschicht). Die Epidermis trägt als äußerste Grenzschicht der Haut eine undurchlässige Hornschicht (Fritsch, 1998). Hauptzellpopulation in der Epidermis sind die Keratinozyten (etwas 90%), daneben enthält die Epidermis Langerhans-Zellen, Lymphozyten, Melanozyten und Merkelzellen. Die Epidermis ist gefäßfrei und die mehreren Schichten sind durch ihre Morphologie und Funktion charakterisiert (Fritsch, 1998). **Abbildung 2-14** stellt den schematischen Aufbau der Epidermis dar.

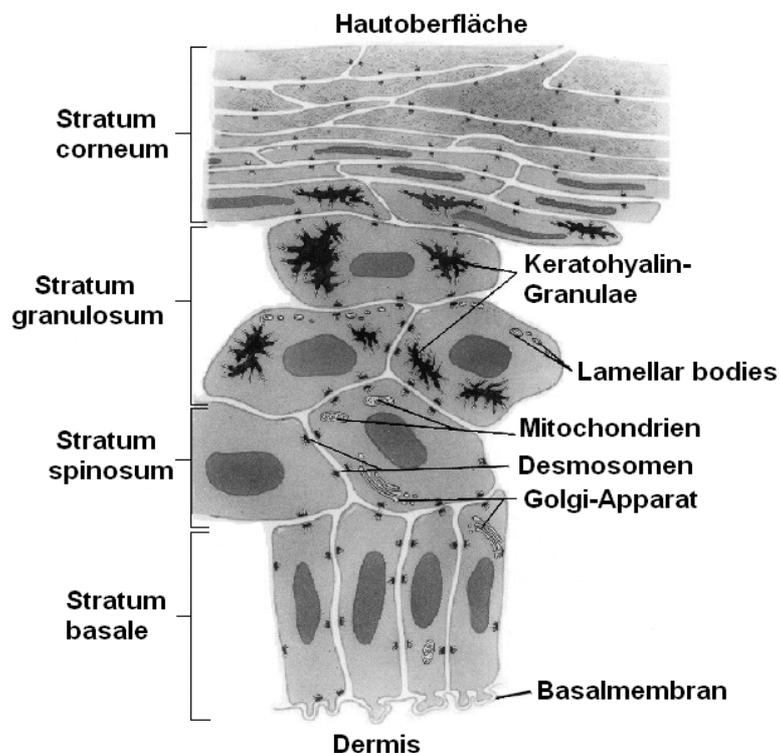


Abb. 2-14: Schematischer Aufbau der Epidermis.

Das *Stratum basale* besteht aus einer Lage zylindrisch aufgebauter Zellen, die durch Hemidesmosomen mit einer Basalmembran verbunden sind (Richter, 1998). Hier beginnt die Erneuerung der Keratinozyten aus den Stammzellen durch Mitose, wobei Zellgewinn im Gleichgewicht mit Zellverlust steht (Fritsch, 1998).

Das *Stratum spinosum* ist durch größere, polygonale Keratinozyten charakterisiert. Trotz deutlicher Interzellularspalten sind die Zellen durch stachelförmige Fortsätze über Desmosomen miteinander verbunden (Leonhardt, 1990). Eine Besonderheit des *Stratum spinosum* sind die sogenannten „*Odland bodies*“, Zellorganellen, die Lipide und Enzyme enthalten. In der aus 2-5 Zellschichten bestehenden Stachelzellschicht geht die Fähigkeit zur Zellteilung mit dem Eintritt der terminalen Differenzierung verloren. Nur unter besonderen Umständen (z.B. Wundheilung) finden vereinzelt noch Mitosen statt. Das *Stratum basale* und das *Stratum spinosum* werden daher auch als *Stratum germinativum* zusammengefasst (Fritsch, 1998).

Mit dem Übergang in das *Stratum granulosum* flachen die durch basophile Keratohyalin granula charakterisierten Keratinozyten ab. Dehydratation tritt ein, Zellkerne und -organellen gehen verloren. Durch Exozytose der *Odland bodies* wird im Interzellularraum die Bildung einer wenig permeablen Kittsubstanz induziert, wodurch die Zelle starr fixiert wird (Fritsch, 1998).

Das *Stratum corneum* ist das Endprodukt der keratinisierten Epidermis, die sich etwa im Zeitraum von 1-2 Wochen erneuert. Die Anzahl der Zellschichten im *Stratum corneum* ist recht variabel. Die Hornschicht besteht jedoch zumeist aus ca. 10 bis 20 Zellschichten voll keratinisierter Korneozyten. Diese verhornten Zellen sind überwiegend aus Keratinfilamenten aufgebaut und werden von einer dicht vernetzten, äußerst stabilen Hülle von Proteinen und Lipiden, dem „*cornified envelope*“ umgeben. Entsprechend einem „Ziegelstein-Mörtel“-Modell ist die Hornschicht im wesentlichen aus den Korneozyten und der interkorneozytären, lamellären Lipidschicht aufgebaut (Elias, 1983). In den tieferen Schichten des *Stratum corneum* erschwert ein enger Interzellularraum die transepitheliale Stoffpassage, oberflächlich lösen sich die Zellen aus dem Epithelverband und schilfern ab. Die Schichtdicke ist neben Geschlecht, Alter und Körperregion von der Intensität der mechanischen Beanspruchung und der Abschilferungsrate der Haut abhängig (Liebich, 1999). Die Hornschicht ist für Wasser und wasserlösliche Substanzen fast undurchlässig, sie ist in ihrer Gesamtheit Träger der Barrierefunktion. Eine hohe Widerstandsfähigkeit besteht gegen physikalische und chemische Noxen, relativ empfindlich reagiert sie dagegen auf organische Lösungsmittel und Detergenzien (Fritsch, 1998). Bei Untersuchungen des pH-Wertes der Haut konnte nachgewiesen werden, dass das *Stratum corneum* im Vergleich zum *Stratum granulosum* (neutraler pH-Wert) einen sauren pH-Wert von ungefähr 4,0-4,9 besitzt. Dieser saure pH-

Wert ist eine wesentliche Voraussetzung für die Barrierefunktion des *Stratum corneum*. Eine Erhöhung des pH-Wertes ist mit einer Abnahme von Integrität und Kohäsion verbunden und bewirkt dadurch eine verminderte Barriere und ein leichteres Eindringen von Keimen (Fluhr, 2001; Behne, 2002; Matousek, 2002; Hachem, 2003). In früheren Arbeiten war bereits ein Zusammenhang zwischen einem veränderten pH-Wert und verschiedenen Hautkrankheiten festgestellt worden. So spielt der pH-Wert eine wesentliche Rolle in der Pathogenese, Vorbeugung und Behandlung von Kontaktdermatiden, atopischer Dermatitis, Ichthyose und Wunden (Matousek, 2002; Rippke, 2002; Öhman, 1998).

Dermis

Die Dermis ist der zwischen der Unterhaut und Epidermis gelegene bindegewebige Anteil der Körperdecke. Vom Grad ihrer Ausbildung wird die Dicke der Haut bestimmt, so hat z.B. unter Haussäugetieren das Schaf die dünnste und das Rind die dickste Lederhaut (Habermehl, 1984). Die Dermis erfüllt komplexe biologische Aufgaben, wie Ernährung der Epidermis und Bereitstellung von Abwehrzellen. Sie ist zudem für die mechanische Festigkeit der Haut verantwortlich. Es lassen sich zwei Schichten unterscheiden: eine dünne, zell- und gefäßreiche, subepidermale *Stratum papillare* und eine dicke, faserreiche *Stratum reticulare* (Smolle, 1998).

Das *Stratum papillare* ist über die Basalmembran mit der Epidermis verbunden. Es ist aus feinmaschigen kollagenen und elastischen Fasern aufgebaut und enthält reichlich ungeformte Grundsubstanz, die für das Wasserbindungsvermögen und damit für den Hautturgor maßgeblich ist. Die Austauschfläche und die Haftung werden durch die regional unterschiedlich starke Ausbildung von Papillarkörpern – fingerförmigen, papillenartigen Verzahnungen von Epidermis und Dermis – bestimmt (Richter, 1998). Die Versorgung, insbesondere die des Stratum germinativum der Epidermis, erfolgt über haarnadelförmige Kapillarschlingen (die auch zur Regulierung der Körpertemperatur beitragen), die gemeinsam mit nervösen Endapparaten in die Papillarkörper hineinreichen. Vorzugsweise befinden sich in dieser Schicht Haare, Talg- und Schweißdrüsen als Abkömmlinge der Epidermis (**Abbildung 2-13**).

Das *Stratum reticulare* stellt ein Netz aus gröberen kollagenen und elastischen Fasern dar, das mechanisch hoch belastbar ist (Richter, 1998). Diese Schicht ist relativ arm an Zellen und

Gefäßen, vorzugsweise kleinere Arterien und Venen zu und von der oberflächlichen Hautschicht passieren diese Bindegewebslagen (Liebich, 1999).

Hypodermis

Die Hypodermis (Unterhaut) besteht aus lockerem Bindegewebe, elastischen Fasern (*Stratum fibrosum*) und Fettgewebe (*Stratum adiposum*). Sie stellt das Bindeglied zwischen der Dermis und den innenliegenden Faszien, Muskeln oder Knochen dar und ermöglicht so die Elastizität der Haut (Eckert, 1992). Die Fetteinlagerungen dienen als Energiereserven und als Kälteschutz und an manchen Stellen auch einer mechanischen Polsterung (Liebich, 1999).

Hautanhangsgebilde

Die *Hautdrüsen* und deren Modifikationen sind embryonal als Abkömmlinge der Epidermis anzusehen, sie ragen jedoch größtenteils in die Dermis hinein. Bei den Haussäugetieren unterscheidet man die holokrin sezernierenden Talgdrüsen von den apokrin sezernierenden Schweiß- und Duftdrüsen, deren Sekrete die Haut mit einem dünnen Fett- und Säuremantel bedecken (Liebich, 1999). Ekkrine „echte Schweißdrüsen“ wie beim Menschen kommen bei den Haussäugetieren nicht vor.

Die *apokrinen Schweißdrüsen* (*Gll. Sudoriferae*) gehen aus dem Epithel der Haaranlage hervor und geben ihr Sekret in die Haarbälge ab; sie können sekundär auch von den Haarbälgen frei werden (Habermehl, 1984).

Die *Talgdrüsen* (*Gll. Sebaceae*) liegen verhältnismäßig oberflächlich, sie sind kranzförmig um die Haarbälge herum angeordnet (Haarbalgdrüsen) (Habermehl, 1984). Der holokrin sezernierte lipidreiche Talg (Sebum) gelangt über weite Ausführungsgänge in den Haarbalg; auf der Epidermis entsteht ein dünner Fettfilm, der die Durchlässigkeit für Wasser und wässrige Flüssigkeiten vermindert und das *Stratum corneum* und die Oberfläche der Haare geschmeidig hält (Liebich, 1999).

Die *Haare* sind aus Epithelzellen der Epidermis entstandene, biegsame und zugfeste Hornfäden, die mit ihren Wurzeln schräg in die Dermis eingelassen sind (Habermehl, 1984). Haare bieten einen Schutz gegen mechanische und thermische Umwelteinflüsse, weiter wird

durch eine dichte Behaarung und starke Pigmentierung UV-Strahlung abgeschirmt (Montagna, 1967; Banks 1993).

2.3.2 Wirkungen des Taurins in der Haut

Die funktionelle Bedeutung von Taurin in der Haut ist noch nicht genau aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, dass die beschriebenen allgemeinen Funktionen der Aminosäure auch in den Hautzellen eine Relevanz besitzen. So könnte die calciummodulierende Wirkung des Taurins bei der Differenzierung der Keratinozyten eine wichtige Rolle spielen (Lobo, 2001). Die Bedeutung dieser Aminosäure bei der Apoptose konnte bereits nachgewiesen werden. Bei einer Erhöhung der extrazellulären Osmolarität kommt es zu einer Erhöhung der Taurinkonzentration in den Keratinozyten und damit zum Schutz der Zellen vor dem Zelltod (Janeke, 2003).

Neben den bereits genannten Effekten des Taurins stellt seine antioxidative Wirkung eine weitere wichtige Funktion in der Haut dar. Bereits in früheren Arbeiten konnte die Bedeutung von freien Radikalen bei der Wundheilung und bei der Schädigung des Kollagens nachgewiesen werden (Högstrom, 1987; Foschi, 1988; White, 1990). Değim (2002) beschreibt den positiven Einfluss von topisch appliziertem Taurin auf die Wundheilung. Dabei kam es zur Reduktion der Peroxidation der Lipide, zu einer Abnahme der Konzentration von Malondialdehyd, einer Erhöhung der Hydroxyprolinkonzentration und daraus resultierend zu einer Verringerung der Kollagenschädigung (Gordon, 1986; Değim, 2002). Collin (2006) beschreibt „Taurin-uptake“ durch die isolierten menschlichen Haarfollikel. Taurin spielt eine wichtige Rolle für den Haarwuchs und vergrößert die Überlebensrate der Haarfollikel. Außerdem schützt Taurin die Haarfollikel gegen (TGF)- β 1 („*transforming growth factor*“), ein *in vitro* Hemmschuh des Haarwuchses.

Die Taurinspiegel im Organismus könnten in einem Zusammenhang mit einer sehr häufig auftretenden Hautkrankheit, der Psoriasis, stehen (Falco, 1966). Durch eine zu niedrige Aufnahme der Aminosäure aus der Nahrung (Zackheim, 1982) oder eine Taurintoleranz (Roe, 1966) könnte eine Erkrankung ausgelöst oder verschlimmert werden. Der genaue Mechanismus konnte indessen noch nicht hinreichend aufgeklärt werden und sollte in den nächsten Arbeiten noch weiter untersucht werden.

2.4 UNTERSUCHUNG DER PENETRATION

Entsprechend den strukturellen Gegebenheiten der Haut können Stoffe das *Stratum corneum* auf vier verschiedenen Wegen durchdringen, die in der **Abbildung 2-15** aufgezeigt sind: Diffusion durch die Hornschicht auf transzellulärem oder interzellulärem Weg und Diffusion durch die Anhangsgebilde auf transfollikulärem oder transglandulärem Weg (Barry, 2001; Neubert, 2001). Die Kenntnis der Penetrationswege von topisch applizierten Substanzen ist Voraussetzung, um die Wirkung von Arzneimitteln und kosmetischen Produkten zu optimieren. Bisher ging man davon aus, dass Substanzen über die Lipidschichten des *Stratum corneum* diffundieren und so die Barriere durchdringen. Das Hautanhangsorgan insbesondere die Haarfollikel spielen eine wichtige Rolle bei den Penetrationsprozessen durch die Haut (Lademann, 2003).

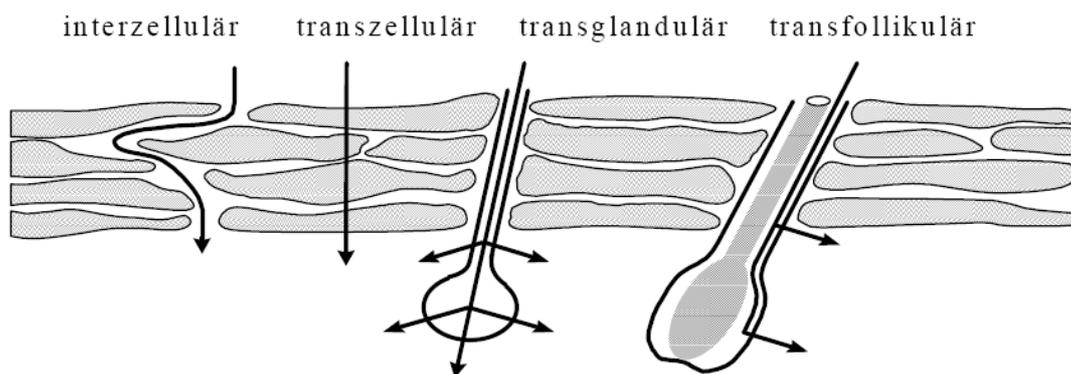


Abb. 2-15: Mögliche Penetrationswege topisch applizierter Substanzen durch das *Stratum corneum* (Neubert, 2001)

Für Untersuchungen der perkutanen Penetration stehen derzeit eine Vielzahl von *In-vivo*- und *In-vitro*-Methoden zur Verfügung (Neubert, 1990; Schaefer, 1990). Die Untersuchungen werden zumeist an menschlicher und tierischer Haut und an sogenannten Hautäquivalenten („künstliche Haut“) durchgeführt (Neubert, 1991; Schaefer, 1990). *In-vivo*-Untersuchungen am Menschen werden nach Riviere (1986) durch ethische Fakten limitiert. Weiter können *In-vivo*-Methoden wegen toxikologischer Gefährdung oder aus Gründen des Strahlenschutzes (radioaktiv markierte Substanzen) nur sehr begrenzt am Menschen angewendet werden (Gloor, 1982). In den letzten Jahren kam es zur Entwicklung zahlreicher *in vitro* Epidermis- und Vollhautmodelle, die insbesondere die Untersuchung der perkutanen Absorption, der Toxizität bei Hautkontakt und des kutanen Metabolismus erlauben sollen.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene Modellen verwendet:

2.4.1 Mehrschichtmembranmodell (MSMM)

Das Mehrschichtmembranmodell wurde von Neubert & Fürst (1991) entwickelt. Es besteht aus einer Grund- und Deckplatte aus Polyacryl, zwischen denen 6-8 Einzelzellen für Parallelbestimmungen positioniert werden können. Eine derartige Zelle setzt sich aus einer Grundscheibe, einer Schablone mit einer Aussparung von 4 cm^2 zum Auftragen der Formulierung und einer Deckscheibe, die den oberen Abschluß der Zelle bildet, zusammen. Zwischen Grundscheibe und Schablone wird die für den jeweiligen Versuch benötigte Art und Anzahl von Glycerol- bzw. Dodecanolmembranen platziert und mit einer Nephrophanmembran von der Grundscheibe abgegrenzt. Die **Abbildung 2-16** stellt den Aufbau des Mehrschichtmembranmodells dar.

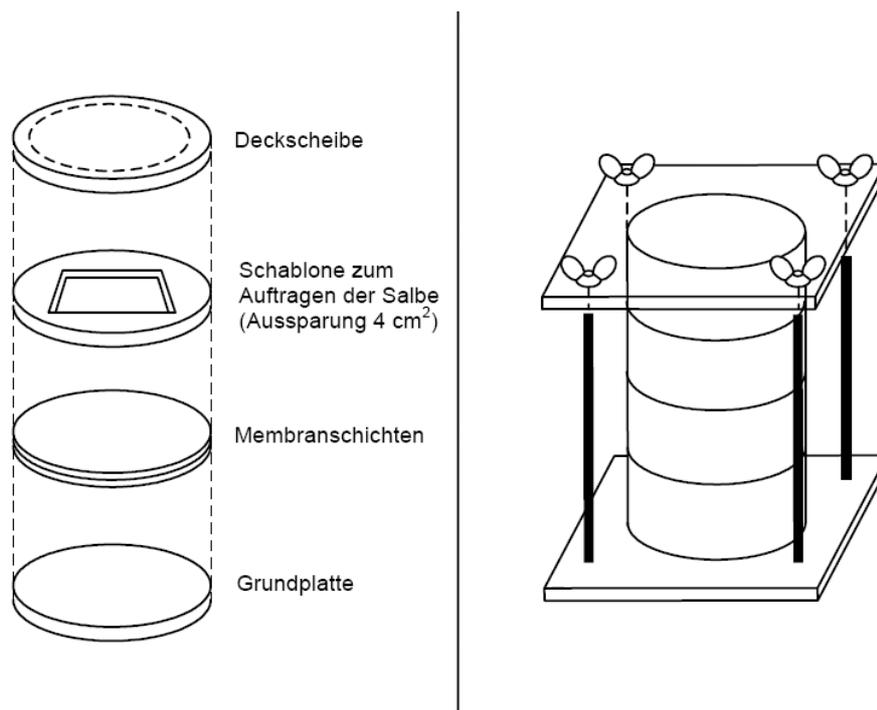


Abb. 2-16: Aufbau des Mehrschichtmembranmodells nach Neubert (1991).

Die künstlichen Membranen bestehen aus Kollodium als Matrix und sind variierbar in Anzahl und Art der Membran. Der Akzeptor dieses Modells kann aus bis zu 6 Membranen bestehen. Die Membranen können entweder lipophile (Dodecanol) oder hydrophile (Glycerol oder Propylenglycol) Additive besitzen und das Modellsystem kann an das Konzentrationsprofil in der menschlichen Haut angepasst werden (Neubert, 1993).

2.4.2 Diffusionszelle nach Franz

Die Franzdiffusionszelle ist ein etabliertes *in vitro* Modell für Studien zur perkutanen Absorption (Franz, 1975; Wagner, 2000), und besteht aus einer doppelwandigen, temperierbaren Glaskammer zur Aufnahme der Rezeptorflüssigkeit, so dass die Temperatur der Hautoberfläche wie im physiologischen Zustand 32 ± 1 °C beträgt (**Abbildung 2-17**).

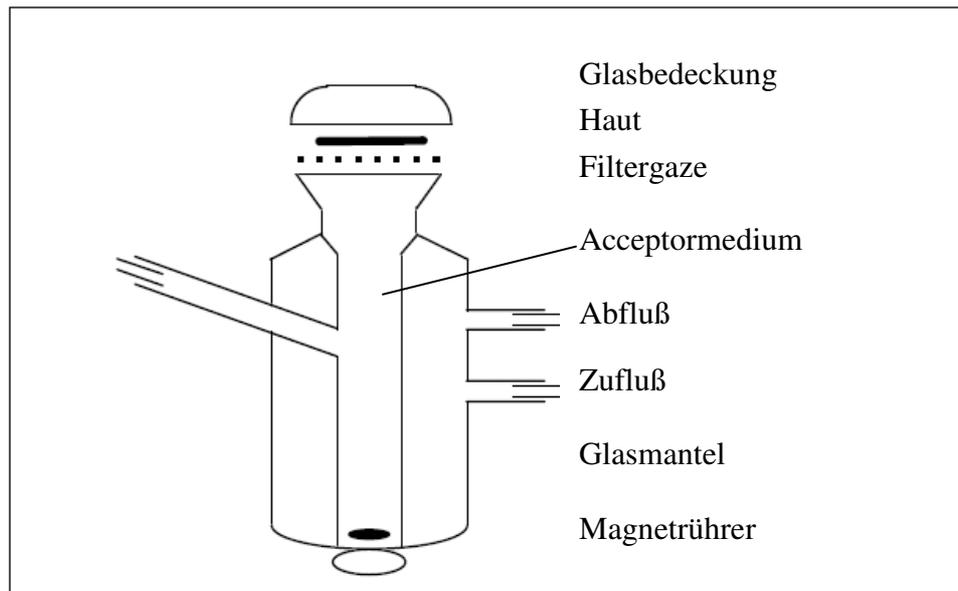


Abb. 2-17: Schematische Darstellung des Aufbaues der sog. Diffusionzelle nach Franz.

Auf dieses Gerät wird entweder das vom subkutanen Fett befreite Hautstück oder nur die Epidermis gelegt und durch einen Glasring und eine Metallklammer so fixiert, dass es mit der dermalen Seite in Kontakt zum Rezeptormedium gelangt. Die epidermale Seite der Haut wird in die trockene bzw. kontrolliert hydratisierte Umgebung gerichtet eingesetzt. Da das wässrige dermale Gewebe wasserlösliche Substanzen leicht diffundieren lässt, stellt es nur eine minimale Beeinflussung für die Penetration der applizierten Substanzen dar. Hydrophobe Substanzen hingegen diffundieren nur sehr langsam durch die Dermis, weshalb im Vergleich zu *In-vivo*-Untersuchungen die Absorption lipophiler Substanzen langsamer erscheint (Bronaugh, 1991). Das Acceptormedium simuliert durch Aufrechterhaltung der Sink-Bedingungen in der Haut während der gesamten Versuchsdauer den Blutfluß (Wagner, 2000). Eine auf das *Stratum corneum* aufgetragene Substanz diffundiert, den Gesetzen der Fick'schen Diffusion folgend, durch die Schichten der Haut und kann anschließend in der Acceptorflüssigkeit nachgewiesen werden. Die gewählte Acceptorflüssigkeit darf das Ausmaß der Penetration der Testsubstanz nicht begrenzen, d.h. die Substanz muss im Acceptormedium

vollständig löslich sein. Die Konzentration der Testsubstanz im Acceptormedium muss während der Versuchsdauer gering bleiben, um eine signifikante Rückdiffusion zu vermeiden. Es muss weiterhin beachtet werden, dass die Barriereigenschaften der Haut, sowie die physikalisch-chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Substanz und die Analytik nicht nachteilig durch die Acceptorflüssigkeit verändert werden. Bei längerandauernden Experimenten ist eine Antibiotikazugabe zur Acceptorflüssigkeit erforderlich (Howes, 1996).

Die Anwendung von Diffusionszellen basiert auf der Annahme, dass die Barriereigenschaften der Hornschicht von exzidierte Haut mit *In-vivo*-Verhältnissen identisch sind. Das ist eine Annahme, die durch viele Untersuchungen gestützt wird. Die Barriereigenschaften der Haut können normalerweise nach Gewinnung der Haut vom Körper und geeigneter Lagerung (-20°C) bis zu drei Monaten erhalten bleiben (Harrison, 1984). Pflucker (1997) untersucht morphologische Veränderungen und die dermale Permeation *in vitro* an exzidierte Schweinehaut nach Lagerung unter verschiedenen Bedingungen im Vergleich zu frischer Haut. Die Autoren finden nach topischer Applikation verschiedener Substanzen keine Änderungen in den Penetrationseigenschaften der Haut. Unter standardisierten Bedingungen gewonnene Haut von verschiedenen Tierspezies ist im Gegensatz zu Humanhaut leicht erhältlich. Letztere steht nur in begrenztem Umfang bei Operationen oder *post mortem* zur Verfügung.

2.5 TOXIZITÄT UNTERSUCHUNG - HÜHNER EIER-TEST (HET-TEST)

2.5.1 Allgemein

Mitte der 1980er Jahre wurde der HET-CAM-Test (HET: Hen's egg test; CAM: Chorionallantois-Membran) von Prof. Lüpke als Ersatzmethode für den Draize-Test am Kaninchenauge entwickelt. Der Hühner Eier-Test ist ein u.a. in der pharmazeutischen, ophthalmologischen und zahnmedizinischen Forschung etabliert und stellt ein schnelles, sensitives und kostengünstiges toxikologisches Experimentalmodell dar (Lüpke, 1985). Beim HET wird die Testung auf toxische Wirkung durch das Einbringen eines Stoffes in oder auf das Gewebe eines bebrüteten Hühnerembryos, bzw. der extraembryonalen Blutgefäßsysteme vorgenommen. Aufgrund der Veränderung der exponierten Gewebe, welche sich Sekunden bis Stunden nach der Stoffexposition zeigen können, werden Rückschlüsse auf die toxikologische Wirkung auf den menschlichen Organismus gezogen (Schendel, 1994; Lüring, 2003). Auftretende Veränderungen im HET-CAM wie z.B. Hyperämie, Hämorrhagie, Lysis und Koagulation sind makroskopisch sichtbar.

Die Überlegung liegt ihm zu Grunde, dass das Innenleben des Hühnereies sehr stark der Retina des Auges ähnelt und folglich ähnliche Reaktionen zu erwarten sind (Lüpke, 1985). Die Ergebnisse und Risikoeinstufungen zeigen i. d. R. eine sehr gute Übertragbarkeit zu den *in vivo*-Befunden am Säugetier (Leighton, 1985; Lüpke, 1986 und 1987; Spielmann, 1991). Andere Autoren jedoch kommen zu entgegengesetzten Ergebnissen. So besteht nach Lawrence (1990) keine gute Korrelation zwischen den Ergebnissen aus dem HET-CAM und dem Draize-Test, so dass der Hühnereitest den Verträglichkeitstest am Kaninchenauge nicht vollständig ersetzt, sondern nur als Vortest für diesen herangezogen werden kann. Debbasch (2005) bescheinigt eine gute Korrelation beider Test und somit verlässliche Prognosen nur für stark reizende Substanzen, Steiling (1999) hingegen nur für Substanzen mit schwacher Reizwirkung. Interpretationen des HET-CAM-Testes erfordern viel Erfahrung seitens des Durchführenden und sind stets mit einer gewissen Subjektivität behaftet.

2.5.2 Probleme Tierschutzgesetzgebung

Prüfungen am bebrüteten Hühnerei stellen einen Grenzfall zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Systemen dar (Lüpke, 1985). Aus ethischen und juristischen Gesichtspunkten wird der HET-

CAM-Test als unbedenklich eingestuft. Der Test gilt nicht als Tierversuch, da in den frühen Entwicklungsstadien (bis zum zehnten Bebrütungstag, wenn das Ei noch als Lebensmittel gilt) von einer nur geringfügig ausgeprägten Innervation der Chorionallantoismembran und damit von einer weitgehenden Schmerzfreiheit während der Versuche ausgegangen werden kann (Lüpke, 1992).

3 EXPERIMENTELLER TEIL

3.1 CHEMIKALIEN

L-Taurin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Alanin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Cystein	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Glycin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Histidin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Arginin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Asparagin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Glutamin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Leucin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Lysin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Methionin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Serin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Prolin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Threonin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
L-Valin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
γ -Cyclodextrin	Fluka (Buchs, Switzerland)
β -Cyclodextrin	Fluka (Buchs, Switzerland)
α -Cyclodextrin	Fluka (Buchs, Switzerland)
(2-Hydroxyethyl)- β -Cyclodextrin	Fluka (Buchs, Switzerland)
Brij [®] 35	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
SDS	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
Fluorescamin	Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, Netherland)

Chloroform	Merk (Darmstadt, Germany)
Aceton	Roth (Karlsruhe, Germany)
Diethylether	Neolab Migge Laborbedarf (Heidelberg, Germany)
Borsäure	Roth (Karlsruhe, Germany)
Natriumlauge	KMF (Lohmar, Germany)
Salzsäure	KMF (Lohmar, Germany)
Glycerol	KMF (Lohmar, Germany)
Acetonitril	J.T. Baker (Deventer, Netherland)
Kollodium	Caelo (Hilden, Germany)
Basiscreme DAC	Caleo (Hilden, Germany)
Ether	J.T. Baker (Deventer, Netherland)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Netherland)

3.2 PUFFERLÖSUNGEN

Die für die Kapillarelektrophorese verwendeten 100 mM Boraxpufferlösungen wurden auf der Basis eines standardisierten Verfahrens für Herstellung von Boraxpuffer wie folgt hergestellt:

Eine Menge von 12,404 g Borsäure und ein Volumen von 100 ml 1 N Natronlauge wurden in einen 1000 ml Messkolben eingefügt und mit bidestilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (Stammlösung A). Als Stammlösung B wurde entweder 0,1 N Natronlauge oder 0,1 N Salzsäure verwendet. Der gewünschten pH-Wert kann erhalten werden, wenn die Stammlösungen A und B genau gemischt werden (**Tabelle 3-1**).

Tab. 3-1: Herstellung von Boraxpuffer in verschiedenen pH-Werten.

pH-Wert	Stammlösung A	Stammlösung B
8	55,9 ml	44,1 ml 0,1 N HCl
9	85,6 ml	14,4 ml 0,1 N HCl
10	59,0 ml	41,0 ml 0,1 N NaOH
11	50,1 ml	49,9 ml 0,1 N NaOH

3.3 STANDARDLÖSUNGEN

Zur Herstellung der Stammlösung wurden 625,7 mg Taurin in einen 100 ml Meßkolben eingewogen und mit Boraxpuffer aufgelöst. Diese Lösung wurde im Kühlschrank maximal eine Woche aufbewahrt. Aus dieser Stammlösung wurden nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur die Standardlösungen durch Verdünnen mit entsprechendem Boraxpuffer hergestellt. Die Berechnung der Taurinkonzentration in der Probe erfolgte mit Hilfe der mittleren Peakfläche des Taurins.

3.4 VORBEREITUNG DER BIOLOGISCHEN PROBEN

Schweiß

Die Schweißproben stammen von 10 gesunden erwachsenen Probanden (29 ± 3 Jahre alt). Die Probe wurde an der Innerseite eines Unterarmes entnommen, da die Haut physiologischerweise dort eine recht hohe Schweißdrüsendichte aufweist. Die Stimulation der Schweißproduktion erfolgte, nach gründlicher Hautreinigung, mittels Pilocarpin Iontophorese (Sweat Inducer, Modell 3700, der Firma Wescor, Logan, Utah 84321 USA). Zum Auffangen des Schweißes wurde das Macroduct Sweat Collection System der gleichen Firma verwendet.

Plasma

Die Plasmaproben stammen von 7 gesunden erwachsenen Probanden (38 ± 4 Jahre alt). Das Plasma wurde mit Acetonitril im Verhältnis 1:3 (v/v) verdünnt. Danach wurde die Lösung 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert um die Proteine zu entfernen. Die Plasmaproben wurden bei -20°C gelagert und wurden innerhalb von 4 Tagen analysiert.

Urin

Die Morgenurinproben stammen von 4 gesunden erwachsenen Probanden (28 ± 4). Der Urin wurde durch einen $0,45 \mu\text{m}$ Nylon Filter (Roth, Karlsruhe, Germany) filtriert. Die Urinproben wurden ohne Deproteinisierung analysiert.

Haut

Die ungefähr 6 mm^2 Hautproben, die an der Brust entnommen wurden, stammen von 12 gesunden Spenderinnen (30 ± 7 Jahre alt) nach den Mammareduktionsplastiken. Das subkutane Fettgewebe wird mechanisch mit einer Schere und Pinzette abpräpariert und verworfen. Zur Lagerung der Hautstücke werden mit einer Lochstanze (20 mm Durchmesser) und Hammer kreisrunde Hautstücke zugeschnitten. Dazu werden die Hautstückchen auf ein Stück Linoleum gelegt und dieses auf ein Holzbrett (als Schutz des Labortisches). Die einzeln ausgestanzten Hautstücke werden luftdicht in Aluminiumfolie verpackt und bei -20°C in einem verschließbaren Polyethylenbeutel aufbewahrt. Zum Versuchszeitpunkt wurden die

präparierten Hautstückchen aus dem Tiefkühler entnommen und bei Zimmertemperatur vollständig aufgetaut und die an der Oberfläche haftende Feuchtigkeit mit Wattestäbchen abgetupft und verworfen.

Extraktion des Taurins aus der Haut

Zur Extraktion des Taurines aus der Haut wurde die Probe mit 500 μl Wasser-Methanol (1:1, v/v) pro 35 mg Hautstück für 30 min in das Ultraschallbad behandelt. Danach wurde das Hautstück entfernt und der Extrakt wurde bei 7000 g 10 min lang zentrifugiert (Labnet, Woodbridge, USA). Die Lösung wurde durch einen Filter (Roth, Karlsruhe, Germany) von 0,45 μm gegeben.

Die extrahierte Taurinmenge nimmt mit der Extraktionszeit bis zum Erreichen des Gleichgewichts zu. Unter Berücksichtigung eines experimentellen Fehlers von 5 % gilt das Gleichgewicht als erreicht. Während sich die extrahierte Taurinmenge generell anfangs mit der Extraktionszeit stark ändert, verliert der Einfluss der Extraktionszeit bis zum Gleichgewicht zunehmend an Bedeutung (**Abbildung 3-1**).

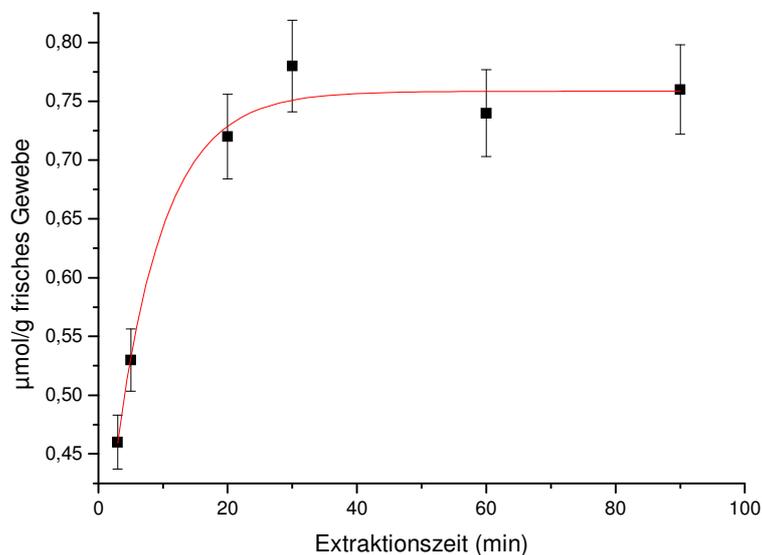


Abb. 3-1: Extraktion des Taurins aus der Humanhaut

Zur Vorbereitung aller Lösungen wurde bidestilliertes Wasser verwendet.

3.5 ANALYTISCHE METHODE – KAPILLARELEKTROPHORESE (CE)

Der prinzipielle Aufbau eines CE-Systems ist schon in **Abbildung 2-3** (siehe theoretischer Teil) schematisch gezeigt. Die Hauptelemente der Kapillarelektrophorese sind demnach die Kapillare selbst, zwei Puffergefäße, die den so genannten Lauf- oder Trennpuffer beherbergen, eine Hochspannungsquelle, die über zwei Platin-Elektroden mit den beiden Puffergefäßen verbunden ist, ein Detektor und ein System zur Datenerfassung.

Aufgrund des geringen Tauringehalts in biologischen Proben muss eine Methode gleichzeitig sehr sensitiv und spezifisch, aber auch unempfindlich gegenüber Störsubstanzen sein. Die Bestimmung und Quantifizierung des Taurins in verschiedenen biologischen Proben wurde mittels Kapillarelektrophorese durchgeführt.

Elektrochemischer Detektor

Da Taurin keine chromophore Gruppe besitzt, können mit den üblichen UV-Detektoren keine befriedigenden Ergebnisse erreicht werden. Als Alternative bietet sich die amperometrische Detektion an, bei der die Verbindungen am Ausgang der Trennkapillare an einer Mikroelektrode detektiert werden. Verschiedene Aminosäuren, die an einer Platin – oder Kohlelektrode direkt oxidiert werden, wie Tyrosin, Tryptophan oder Cystein (Hg-Elektrode (Xu, 2003) können so mit hoher Empfindlichkeit detektiert werden. Andere Aminosäuren, wie Alanin oder Leucin führen an einer positiv polarisierten Cu-Elektrode zur Bildung von Cu-Komplexen und können so empfindlich nachgewiesen werden. (Ye, 1994).

Die CE-Anlage wurde am Institut für Pharmazeutische Chemie entwickelt, ist aber bis zum jetzigen Zeitpunkt kommerziell nicht verfügbar. Als Arbeitselektroden kam die Goldmikroelektrode mit einem Durchmesser von 100 µm zur Anwendung. Ein Mikromanipulator (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) wurde am Ende der Kapillare (CS Chromatography Service, Langenrwehe, Deutschland) befestigt und in ca. 20 µm-Entfernung zu einer in einem Glasrohr versiegelten Goldmikroelektroden justiert. Am Ende der Kapillaren wurde einen Controller (Carl Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. In der Detektorzelle befindet sich als Arbeitselektrode eine Goldmikroelektrode, als Referenzelektrode Ag/AgCl/3 mol/l KCl und als Gegenelektrode eine Platinelektrode (**Abbildung 3-2**). Mittels der Referenzelektrode wird das Potential der Gegenelektrode fixiert und über einen Potentiostaten der Spannungsabfall zwischen Arbeitselektrode und

Gegenelektrode kompensiert. Fast am Ende der Kapillare wurde ein Loch angebracht, wie es ist in der **Abbildung 3-2** dargestellt wurde, um eine Beeinflussung des Detektionspotenzials durch den Elektrophoresestrom zu minimieren. Der Stromfluß in dem Spalt zwischen Kapillarende und Arbeitselektrode führt infolge des Elektrolytwiderstands zu einem Spannungsabfall, der das Potenzial der Arbeitselektrode verfälscht. Durch das Loch wird der größte Teil des Elektrophoresestroms abgeleitet. Allerdings geht hier auch ein geringer Teil des Analyten verloren.

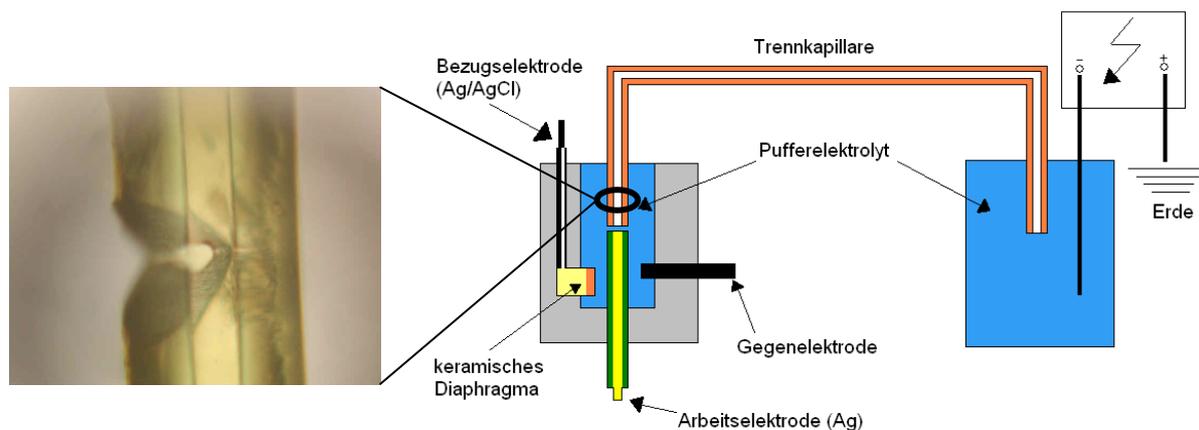


Abb. 3-2: Aufbau der verwendeten der Kapillarelektrophorese mit elektrochemischer Detektion und ein Foto des Lochs fast am Ende der Kapillare.

Eine empfindliche Methode wurde aus der elektrokatalytischen Oxidation von Aminosäuren an einer Goldelektrode abgeleitet. Die Oxidation der Amino-Gruppe und der Goldelektrode finden gleichzeitig bei positivem Potential statt. Aber die Elektrodenoxidation ist reversibel und die Oxidation der Amino-Gruppe nicht. In alkalischer Lösung (Boraxpuffer, pH 11, 20 mM) werden Aminosäuren an der Goldoberfläche bei Potentialen um 0V (gegen die Ag/AgCl-Referenzelektrode) adsorbiert und anschließend bei etwa 700 mV oxidiert (**Abbildung 3-3**). Dabei wird auch die Goldoberfläche oxidiert, es bildet sich eine AuO-Monoschicht, die eine weitere Detektion verhindert und deshalb cyclisch entfernt werden muss. Dazu wird, nach der Desorption der Oxidationsprodukte der Aminosäuren bei hohem Potential ein negatives Potential angelegt, um die AuO-Monoschicht zu reduzieren und eine aktive reine metallische Goldoberfläche zu erzeugen. Danach wird das Adsorptionspotential aufgeschaltet und anschließend der Detektionsstrom registriert. Diese Detektion wird als pulsamperometrische Detektion bezeichnet. Das relativ große Signal der AuO-Bildung kann

bei Anwendung der so genannten integrierten Pulsamperometrie eliminiert werden. Da die elektrischen Ladungen der AuO-Bildung und -Reduktion entgegengesetzt gleich sind, können sie rechnerisch kompensiert werden. Dazu wird die Ladung durch Integration sowohl während der Oxidations- als auch während der Reduktionsphase bestimmt und die für die irreversible Oxidation der Aminosäure geflossene Ladung als Differenz bestimmt. Daran schließt sich ein Reinigungsschritt an, die dabei fließenden Ströme werden nicht erfasst. Der komplette Potenzialverlauf ist in **Abbildung 3-3** zu sehen. Im Elektropherogramm erscheint kein Oxidationssignal der Goldelektrode, da diese bei Potentialen ≤ 0 mV (**6**) wieder reduziert wird. Also entspricht das erzielte Taurin-Signal der Integration des Stroms während des hohen und niedrigen Potentials (**5** und **6**).

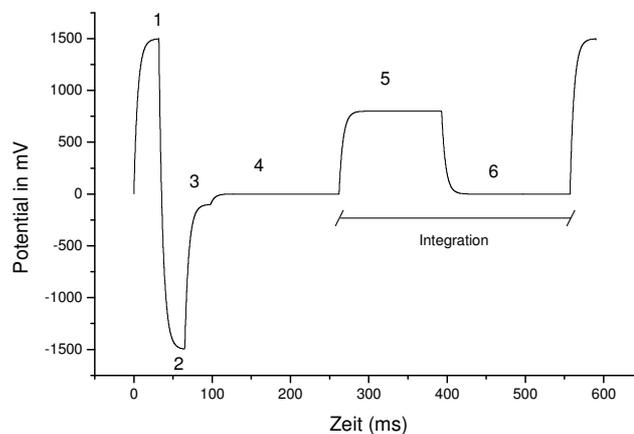


Abb. 3-3: Sequenz der verwendeten Potentiale zur Bestimmung des Taurins. (1) und (2) Reinigung der Goldelektrode; (3) Adsorption der Analyten an der Elektrode; (4) Verzögerungsschritt; (5) und (6) Integration des Stroms.

Die Probenaufgabe erfolgte hydrostatisch für 10 s und 10 cm Höhenunterschied. Die Trennung wurde unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

Elektrolyt:	Borsäure
Elektrolytkonzentration:	20 mM
pH-Wert:	11
Kapillarlänge:	81 cm
Kapillarinne Durchmesser:	50 μ m
Angelegte Spannung:	21,5 kV

Fluorimetrischer Detektor

Hierbei wurde eine mit einem fluorimetrischen Detektor (Model ARGOS 250B, Basel, Schweiz - Anregungsfilter: 350-400 nm, Emissionsfilter: 495 nm) gekoppelte Kapillarelektrophorese (Clinical Systems Division, Models Prince, Crystal 300 Series Part Number, Emmen, Niederland) verwendet. Als Datenerfassungssystem wurde Borwin[®] version 1.21.07 (JMBS Developpements, Grenoble, Frankreich) verwendet. Als Fluoreszenzmarker zur Derivatisierung des Taurins wurde Fluorescamin ausgewählt und die Reaktion ist im **Abbildung 3-4** dargestellt. Fluorescamin zeigt ein Absorptionsmaximum bei 400 nm. Fluorescamin ist ein bekanntes Chromophor, das allein keine fluoreszierenden Eigenschaften hat, reagiert es aber mit einer primären Amino-Gruppe, entsteht ein fluoreszierendes Derivat. Zur Derivatisierung wurde 10 µl Probe mit 150 µl Acetonitril, 90 µl bidestilliertes Wasser und 10 µl Boraxpuffer (pH 10, 20 mM) gemischt. Danach wurde 20 µl Fluorescaminlösung (5 g/l in Acetonitril) in dieser Mischung zugesetzt. Die resultierende Lösung wurde bei CE analysiert.

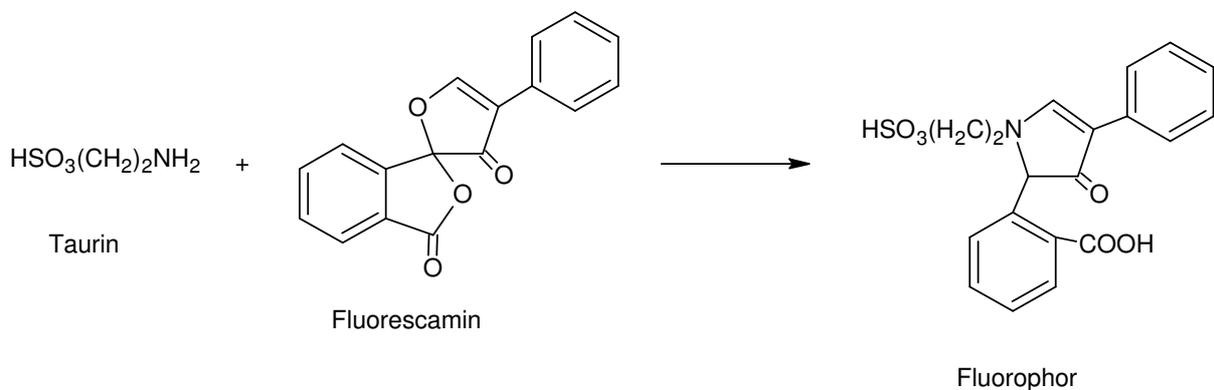


Abb. 3-4: Struktur des Taurins, Fluorescamin und Taurin-Fluorescamin Derivate.

Vor jeder Probenmessung wurde die Kapillare mit NaOH (0,1 N) bei 1000 mbar für 60 s und dann mit Boraxpuffer (pH 10, 20 mM) bei 1000 mbar für 60 s gespült.

3.6 VALIDIERUNG DER CE-METHODE

Die Validierung der entwickelten Methode wurde nach den Richtlinien der Food and Drug Administration (FDA, Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, 2001) durchgeführt.

Selektivität

Die Selektivität ist die Fähigkeit einer analytischen Methode, alle interessierenden Analyten ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten (z.B. Verunreinigung, Nebenprodukte, Degradationsprodukte, Matrix usw.) zu erfassen und sie somit eindeutig zu identifizieren.

Bestimmt wurde die Selektivität durch Vergleich der Elektropherogramme einer Leerprobe (nur natives Taurin) und einer Probe, der Taurin zugesetzt wurde.

Präzision und Richtigkeit

Präzision und Richtigkeit bestimmen die Genauigkeit einer analytischen Methode. Die Präzision ist ein Maß für die Übereinstimmung (Streuung) der Messergebnisse bei wiederholter Durchführung des Analysenverfahrens mit einer homogenen Probe und gibt somit Hinweise auf zufällige Fehler. Die statistische Größe der Präzision ist die relative Standardabweichung (RSD), oder synonym der Variationskoeffizient (VK), der wie folgt berechnet wird:

$$VK = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}}{\bar{x}} \cdot 100[\%] \quad \text{Gleichung 13}$$

VK = Variationskoeffizient

\bar{x} = Mittelwert aus n Einzelmessungen

x_i = Einzelmesswert

n = Anzahl der Messungen

Prinzipiell unterscheidet man zwischen der Wiederholpräzision oder Wiederholbarkeit (repeatability) und der Vergleichspräzision (reproducibility), bei dem bestimmte Parameter verändert werden (z.B. Gerät, Probe, Zeit etc.).

Zur Bestimmung der Wiederholpräzision wird eine stabile Probe mindestens fünfmal unter denselben Operationsbedingungen innerhalb eines kurzen Zeitraums vermessen. Da diese Präzision zur Beurteilung der Genauigkeit des analytischen Gerätes dient, nennt man sie auch System- oder Gerätepräzision. Zur Ermittlung der Präzision der gesamten analytischen

Methode (Methodenpräzision) wurden fünf Messproben mit unterschiedlicher Konzentration fünfmal jeweils unabhängig voneinander hergestellt und vermessen. Die Methodenpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch alle Schritte der Methode verursacht werden. Sie ist innerhalb eines Tages zu bestimmen (Serienpräzision).

Die Vergleichspräzision umfasst verschiedene Messserien bei Variation bestimmter Parameter wie Zeit, Bearbeiter, Gerät, Reagenzien etc. Zur Bestimmung der Präzision über einen längeren Zeitraum (Tag zu Tag) wurden fünf Proben unterschiedlicher Konzentration an fünf aufeinander folgenden Tagen vermessen.

Die Richtigkeit drückt die Übereinstimmung zwischen dem gefundenen Wert und einem als richtig akzeptierten Wert oder einem akzeptierten Referenzwert aus. Sie ist ein Lageparameter und gibt einen Hinweis auf systematische Fehler.

Sie kann durch Vergleich der über die Kalibrierfunktion errechneten Konzentration und der nominalen Konzentration beschrieben werden. Als Maß für die Abweichung dient der prozentuale relative Fehler (Relative Error, RE), der wie folgt berechnet wird:

$$RE = \frac{(c - c_{nom}) \cdot 100}{c_{nom}} [\%] \quad \text{Gleichung 14}$$

RE = Relative Error

c = Errechnete Konzentration

c_{nom} = Nominalkonzentration

Die Richtigkeit lässt sich folglich nach folgender Gleichung bestimmen:

$$\text{Richtigkeit} = RE + 100 [\%] \quad \text{Gleichung 15}$$

Die experimentelle Bestimmung der Richtigkeit erfolgt über die Quantifizierung der drei unterschiedlich konzentrierten Taurin-Proben an fünf verschiedenen Tagen.

Wiederfindung

Da die biologischen Proben (Plasma, Urin, Hautextrakt und Schweiß) als Matrix für eine Validierung bzw. für die Kalibrationsreihen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen, wurde überprüft, ob Puffer als Matrix für die Kalibratoren geeignet ist. Die

Ermittlung der Wiederfindungsrate unter Verwendung von biologischen Proben als Probenmatrix erfolgt durch Aufstockungsexperimente (sog. „spiken“). Im Rahmen der Versuche wurden sowohl die biologische Proben als auch die Puffer mit jeweils gleichen Mengen der Analyten versetzt und analysiert. Die absolute Größe der Abweichung wurde nach folgender Gleichung berechnet:

$$W = \frac{\bar{x}_{biol}}{\bar{x}_{Puffer}} \cdot 100[\%] \quad \text{Gleichung 16}$$

W = prozentuale Wiederfindungsrate

\bar{x}_{biol} = Mittelwert aus n Einzelmessungen (biologische Proben als Matrix)

\bar{x}_{Puffer} = Mittelwert aus n Einzelmessungen (Matrix Puffer)

Linearität, Arbeitsbereich

Die Linearität ist die Fähigkeit einer Methode, innerhalb eines gewissen Bereichs Testergebnisse zu erzielen, die der Konzentration des Analyten direkt proportional sind.

Die Beziehung zwischen Konzentration und Messsignal wurde mittels Kalibrierfunktion bestimmt. Der Arbeitsbereich, dessen Spanne vom LLOQ (lowest limit of quantification) bis zum ULOQ (upper limit of quantification) reicht, orientierte sich an den zu erwartenden Konzentrationen des Analyten in biologischen Proben. Für jede Kalibrierfunktion wurden jeweils sechs Standards vermessen.

Zur Beurteilung der Regression wurden der Korrelationskoeffizient r und die Residuen, die prozentuale Abweichung der experimentellen von den mittels Regressionsgerade berechneten Werten, herangezogen. Ferner wurde getestet, ob eine gewichtete lineare Regression ($1/x$ und $1/x^2$) zu einer besseren Anpassung führt.

Eine Wichtung empfiehlt sich immer dann, falls der Arbeitsbereich relativ groß ist (> Faktor 10). In diesem Fall ist in alle Regel Homoskedastizität (d.h. Varianzenhomogenität der Messwerte) nicht gegeben. Durch die Wichtung wird eine zu starke Beeinflussung der Regression, bedingt durch die relativ größeren Abweichungen der hohen Messwerte, vermieden (Almeida, 2002).

Bestimmungs- und Nachweisgrenze

Nach den Richtlinien ist die Bestimmungsgrenze (LLOQ) eines Analysenverfahrens die geringste Analytmenge in einer Messprobe, die mit hinreichender Präzision und Richtigkeit quantifiziert werden kann. Für die LLOQ wird hinsichtlich der Präzision ein Variationskoeffizient $\leq 20\%$, hinsichtlich der Richtigkeit ein relativer Fehler bis 20% gefordert (Guidance for Industry, 2001).

Die Nachweisgrenze (Limit of Detection, LOD) ist die geringste Analytmenge, die detektiert, aber nicht exakt quantitativ bestimmt werden kann. Sie wurden basierend auf einem Signal-Rausch-Verhältnis (Signal-to-noise ration) von 3:1 ermittelt.

3.7 LIBERATIONS- UND PENETRATIONSVERHALTEN

Verwendete Formulierung

Bei den In-vitro-Liberations- bzw. Penetrationsuntersuchungen der konventionellen Formulierungen schnitt Basiscreme DAC nach 30 min geringfügig besser ab, verglichen mit der lipophilen und der hydrophilen Grundlage (Jahn, 2001). Weiterhin werden den in dieser amphiphilen Zubereitung enthaltenen Inhaltsstoffen mittelkettige Triglyceride (7,5 %) und Propylenglycol (10 %) penetrationsfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Aus diesen Gründen kam die Basiscreme DAC (Deutscher Arzneimittel-Codex, 2000), deren Zusammensetzung nachfolgend aufgeführt ist, mit einer maximalen Menge an inkorporiertem Taurin (1%) für die Penetrationsstudien an exzidiierter Humanhaut und künstlichen Membranen zum Einsatz.

Basiscreme DAC	Glycerolmonostearat 60	4,0 g
	Cetylalkohol	6,0 g
	Mittelkettige Triglyceride	7,5 g
	Weißes Vaseline	25,5 g
	Macrogol-20-glycerolmonostearat	7,0 g
	Propylenglycol	10,0 g
	Wasser	ad 100,0 g

Der Gehalt von Taurin in den Formulierungen wurde in regelmäßigen Abständen durch CE mit fluorimetrischem Detektor kontrolliert. Für die Creme konnte über einen Zeitraum von einem Jahr keine Abweichung vom Sollgehalt von 1 % festgestellt werden. Des weiteren ergaben sich keine Anzeichen für Instabilitäten.

Die Durchführung der Liberations- bzw. Penetrationsuntersuchungen des Taurins erfolgten mit Hilfe der Mehrschichtmembranmodelle und der Diffusionszelle nach Franz.

3.7.1 Durchführung der Versuche am in vitro Mehrschichtmembranmodell

Die in vitro-Liberation des Taurins aus Basiscreme konnte unter Nutzung des Mehrschichtmembranmodellsystems nach Neubert (1993) bestimmt werden (**Kap. 2.4.1**). Zur Optimierung der Versuchsbedingungen für den hydrophilen Arzneistoff musste die Zusammensetzung des Akzeptors verändert werden. Anstelle des lipophilen Akzeptorlipides Dodecanol trat Glycerol, welches durch seine höhere Hydrophilie bessere Lösungseigenschaften für Taurin besitzt.

Herstellung der Glycerol-Collodium-Membranen

Zur Produktion der künstlichen Membranen wurde eine Mischung aus 4 g Glycerol in Ether / Ethanol (8,5:1,5, v/v) ad 100 g und 4%iger Kollodiumlösung im Masseverhältnis 1:1 hergestellt. Davon wurden anschließend 70 ml auf die plangeschliffene Glasplatte eines Filmziehgerätes (institutseigene Herstellung) gegeben, mit Hilfe einer Abziehvorrichtung (in definierter Spalthöhe von der Glasplatte entfernt) homogen verteilt und zur Verdunstung der Lösungsmittelanteile ca. 12 Stunden stengelassen. Anschließend wurden die Membranen mit Hilfe eines Skalpell aus geschnitten (Durchmesser ca. 4 cm).

Berechnung der nötigen Membrananzahl

Eine wichtige Voraussetzung zum Erreichen optimaler Liberationsergebnisse ist das Vorliegen von *Sink*-Bedingungen. Um das zu gewährleisten, kann die Art und Anzahl der verwendeten Membranen in Abhängigkeit von der Löslichkeit des jeweiligen Arzneistoffs variiert werden. Für Taurin ergibt sich auf der Basis der bei 32°C ermittelten Sättigungslöslichkeit von 4,22 mg/ml für eine 4%ige Glycerolmembran eine maximale

Aufnahmekapazität von 29,54 µg Taurin. Folglich wären nach Applikation von 10 mg einer 1%igen Formulierung für die Gewährleistung von *Sink*-Bedingungen mit einer maximalen Akzeptorbelegung von 10% theoretisch ~ 4 Membranen nötig. Deswegen wurden für die folgenden Untersuchungen zur Liberation von Taurin vier Glycerolmembranen verwendet. Das entspricht bei 1%igen Vehikeln einer Akzeptorauslastung von 83,54% für den Fall einer vollständigen Freisetzung.

Versuchdurchführung

Zur Vorbereitung der Zellen wurde eine Nephrophanfolie auf die Grundscheibe gelegt. Sie dient als Schutz des Zellenmaterials vor eindringenden Bestandteilen aus der Zubereitung. Darüber wurden entsprechend der Bestimmung der Akzeptorkapazität vier hydrophile Membranen möglichst luftblasenfrei angeordnet. Um das spätere Trennen der Membranen zu erleichtern, wurden schmale Nephrophanstreifen an den Rändern zwischen die Membranen gelegt. Die obere Schablone fixierte die Membranschicht.

Auf die von der Schablone vorgegebene Applikationsfläche von 4 cm² werden mit einem Füllspatel ca. 10 mg der Basiscreme aufgetragen. Die gleichmäßige Applikation soll eine konstante Schichtdicke der Formulierung gewährleisten. Das Modell wird zusammengesetzt, verschraubt und während der Versuchsdauer in Aluminiumfolie verpackt in einem Thermostaten bei 32°C aufbewahrt. Nach einer Inkubationszeit von 60, 120 und 300 min erfolgte die Entnahme der Zellen mit anschließender Auftrennung der Membranen und Extraktion des liberierten Taurins. Mit dem Extraktionsmedium (2 ml bidestilliertes Wasser) wurde Taurin 30 min lang unter Schütteln aus den Membranen eluiert. Das Extrakt wurde mit Hilfe von ein 0,45 µm Filter filtriert und dann bei CE mit fluorimetrischem Detektor vermessen.

3.7.2 Diffusionszelle nach Franz

In der vorliegenden Arbeit diente die Diffusionszelle nach Franz zur Untersuchung der Penetration des Taurins in die Haut.

Präparation der Haut

Die für die Penetrationsstudien verwendeten Hautpräparate stammten von Mammareduktionsplastiken. Das Material wurde innerhalb von 2-4 h nach der Operation aufgearbeitet. Dazu erfolgte zunächst die Säuberung mit isotonischer NaCl-Lösung runder Stücke mit Hilfe eines Lochs Eisens (Durchmesser von 2 cm), so dass danach einzeln in Aluminiumfolie verpackte Präparate bei -20°C im Tiefkühlschrank für maximal eine Woche gelagert werden konnten. Das Alter der Probandinnen lag zwischen 18 und 33 Jahren.

Versuchsdurchführung

Die Diffusionszellen bestehen aus einer nach oben offenen Rezeptorkammer mit 20 ml Fassungsvermögen. Ein Zugang zu der Rezeptorkammer befindet sich am Boden und ein weiterer unter dem Hals. Über den oberen Zugang erfolgt die Probenentnahme, der untere dient dem Volumenersatz. Auf dem trichterförmigen Hals der Rezeptorkammer befindet sich ein Glaszylinder mit einem Durchmesser von 1,6 cm. Durch das Einspannen der Haut wird er zur nach oben offenen Donorkammer. Der Zylinder ist mit einer Klammer an der Rezeptorkammer befestigt. Die Rezeptorkammer ist von einem Glasmantel mit Zu- und Ablauf umgeben. Mittels einer Pumpe wird durch diesen Glasmantel in einem Wasserbad erwärmtes Wasser gepumpt, so dass die Temperatur der Rezeptorflüssigkeit mit $32 - 34^{\circ}\text{C}$ der der Hautoberflächentemperatur entspricht. Als Rezeptorflüssigkeit wird ein Phosphatpuffer (physiologische Lösung, pH 7,4) verwendet. Sie wird kontinuierlich gerührt.

Die Hautproben (ca. $3,1416 \text{ cm}^2$ Hautgröße) wurden nun in die auf 32°C vorgewärmte Diffusionszelle gespannt, so dass die Hautunterseite mit der Filtergaze direkt an das Akzeptormedium grenzt, welches zur Verringerung der Diffusionsschichtdicke stetig gerührt wird.

Zur Bestimmung der penetrierten Taurinmengen wurden nach Ablauf der jeweiligen Applikationszeit (60 und 300 min) die Hautproben aus der Diffusionszelle entnommen und die nicht penetrierten Anteile der Präparation mit einem Wattestäbchen vorsichtig von der Oberfläche entfernt. Zur Untersuchung der Verteilung des Taurin in jeder Hautschicht wurden die einzelnen Hautschichten horizontal zur Epidermis nach folgendem Schema abgetrennt (**Tabelle 3-3**). Aus dem Hautstück wurden mit 6 mm ($0,848 \text{ cm}^2$) Hautstanzen jeweils 3

Biopsien entnommen. Diese wurden einzeln mit einem Gefriermikrotom (Reichert-Jung, Modell 1206) bei - 40°C horizontal zur Epidermis in der angegebenen Dicke laut Schema geschnitten.

Tab. 3-3: Sektionsnummer und die Dicke der Hautschichten nach dem Penetrationsverhalten.

Hautschichten	
SC	1 Schnitt a 10 µm
EP	4 Schnitte a 20 µm
DR 1	5 Schnitte a 40 µm
DR 2	5 Schnitte a 40 µm
DR 3	5 Schnitte a 40 µm
DR 4	5 Schnitte a 40 µm
DR 5	5 Schnitte a 40 µm

Die Extraktion des Taurins wurde wie in geschriebenem **Kap. 3-4** beschrieben durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Proben filtriert und bei CE mit fluorimetrischem Detektor vermessen.

3.8 TEST AUF VERTRÄGLICHKEIT

Hühnerei-Test (Methode nach Lüpke, 1985)

Für die Prüfung wurden Hühnereier (Rasse „New Hampshire“, Nutztierwissenschaftlichen Zentrum Merbitz, Nauendorf, Deutschland) eingesetzt. Die Eier wurden bei 37 (± 1) °C und 65 (± 5) % rel. Luftfeuchte inkubiert. Am siebten Tag nach Bebrütungsbeginn wurden die Eier durchleuchtet, um festzustellen, ob das Ei belegt ist. Anschließend wurden sie mit dem stumpfen Pol (Luftblase) nach oben aufrecht gestellt und für weitere 24 h inkubiert. Am achten Tag wurde die Schale mit einer Präparationsnadel im Bereich der Luftkammer angestochen und die Schale mit einem Skalpell abgeschnitten. Die freigelegte Eihaut wurde mit einer Pinzette vorsichtig abpräpariert und die geöffneten Eier wurden unter IR-Licht für 30 min ausgestrahlt. Anschließend wurde 100 µl Taurinlösung (0,25, 1 und 2 % in Phosphatpuffer, pH 7,4) auf die darunter liegende Chorioallantoismembran aufgetragen. Nach 10 min unter IR-Licht wurden die Eier geprüft.

Auswertung

Die Reizwirkung wurde makroskopisch bewertet. Die Ergebnisse wurden nach dem in **Tabelle 3-4** angegebenen Schema protokolliert. Nach Aufbringen von schleimhautreizenden Substanzen zeigt die CAM häufig folgenden typischen Reaktionsverlauf: Der Blutfluss stockt und beginnt zu pulsieren. Bei stark reizenden Substanzen kann es zu Ausblutungen aus den Kapillaren kommen. Die Folge ist eine Minderdurchblutung des Gewebes; die Venen verarmen an Blut und werden dadurch für den Betrachter „unsichtbar“.

Tab. 3-4: Bewertungsschema der Reizantwort im HET-CAM-Test nach Gröler (2000).

Reizantwort	Ausprägung	Beschreibung der HET-CAM
Keine Hyperämie	gering	1a
	mäßig	1b
	stark	1c
Hämorrhagie	vereinzelt	2a
	häufig	2b
	massenhaft	2c
Lyse	Gefäße makroskopisch nicht erkennbar	3
Koagulation	Gefäß-Thromboisierung	4

4 ERGEBNISSE

Der Ergebnisteil ist in fünf Kapitel unterteilt. Das entwickelte CE-Verfahren (fluorimetrische bzw. elektrochemische Detektoren) für die Bestimmung des Taurins und die Validierung der Methoden wird in **Kap. 4.1** bzw. **4.2** vorgestellt und untersucht. Die anschließenden Arbeiten unterteilen sich in der Quantifizierung des Taurins in den biologischen Proben (**Kap. 4.3**). Zum Schluss werden die Untersuchungen der Diffusion des Taurins (**Kap. 4.4**) und der Verträglichkeit (**Kap. 4.5**) untersucht.

Um die biologischen Proben (Hautextrakt, Plasma, Urin und Schweiß) von gesunden Menschen auf Taurin untersuchen zu können, wurden zwei kapillarelektrophoretische Methoden entwickelt. Die Ergebnisse dieser Methoden sind in den nachfolgenden Punkten aufgeführt.

4.1 ENTWICKLUNG DER CE-METHODE – FLUORIMETRISCHER DETEKTOR

VALIDIERUNG DER METHODE

pH-Abhängigkeit

Abbildung 4-1 zeigt die Abhängigkeit der Peakfläche des Taurins vom pH-Wert des Laufpuffers (Boraxpuffer, 20 mM). Die Kurvenanpassung erfolgte durch polynomische Regression. Das Maximum der Kurven lag bei 9,98. Als pH-Optimum für den Laufpuffer wurde deshalb 10 definiert. Sowohl die Peakfläche aber auch die Trennung des Peaks und die Migrationszeit kann von dem pH-Werte des Laufpuffers beeinflusst werden.

Zunächst musste ein geeigneter pH-Wert für jede biologische Matrix gefunden werden. Eine starke pH-Abhängigkeit von Elektropherogrammen des Hautextrakts (**Abbildung 4-2**) wurde hierbei bemerkt. Bei dem Vergleich von fünf verschiedenen pH-Werten (von 8 bis 11) stellte sich der pH-Wert 10 für alle biologischen Proben als der am besten geeignetste heraus. Die Zunahme der Peakschärfe wurde bei pH 10 erreicht, wobei der Taurin-Peak nur partiell von dem Alanin-Peak getrennt ist. Allerdings konnte auch mit diesem Trennsystem keine befriedigende Trennung des Taurin-Peaks erreicht werden. In den Urin- und Plasmaproben wurde überhaupt keine Trennung des Taurin-Peak bei den verwendeten pH-Werten erreicht.

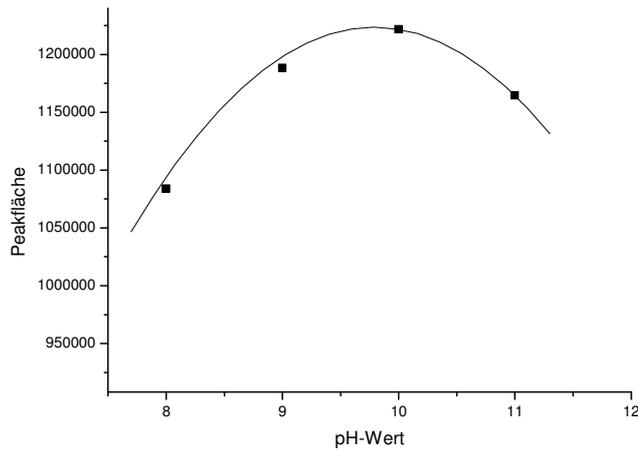


Abb. 4-1: Abhängigkeit der Peakfläche des Taurins vom pH-Wert des Laufpuffers (Boraxpuffer, 20 mM). Konzentration des Taurins jeweils 10 µg/ml in Boraxpuffer pH 10 (20 mM). Bedingungen: Injektionsvolumen: 4,3 nl; Injektionsdruck: 30 mbar; Injektionszeit: 30 s; Spannung: 25 kV; Kapillare: 75 µm Durchmesser; 106 cm Länge insgesamt; 93 cm bis Detektor.

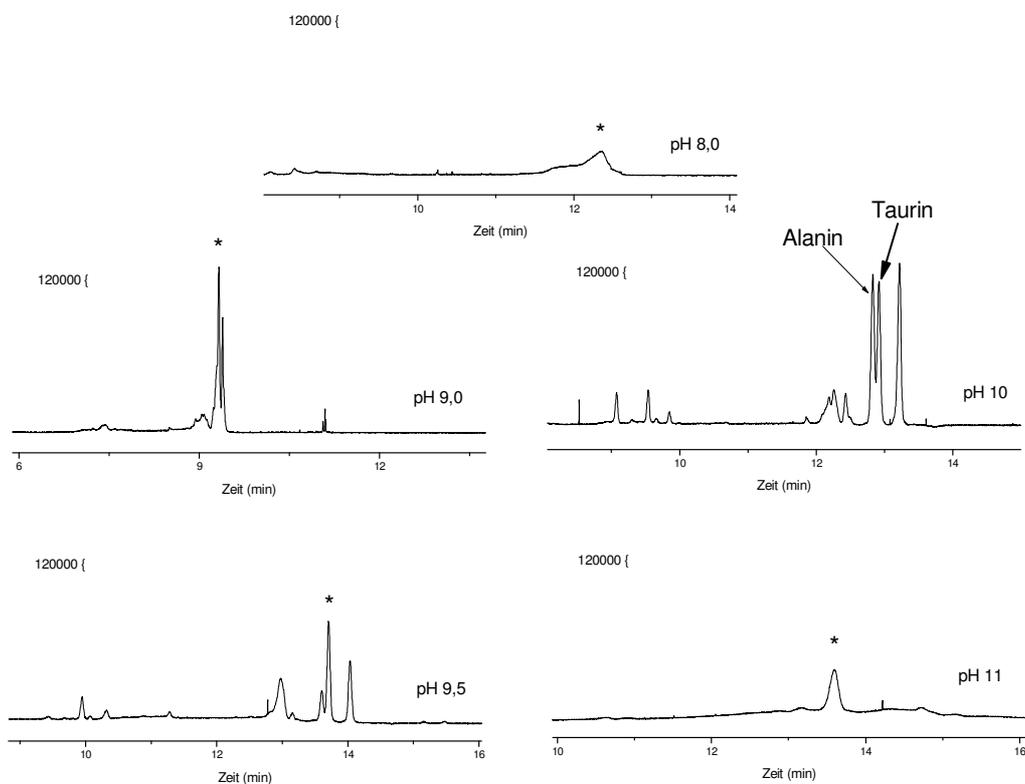


Abb. 4-2: Einfluss des pH-Wertes auf die Elektropherogramme des Hautextrakts. Bedingungen: wie **Abb. 4-1**. * mit anderen Aminosäuren komigrierter Taurin-Peak

Selektivität – Pufferadditive Effekte

Im Rahmen der Selektivitätsuntersuchung wurden bei neun verschiedenen Proben die Elektropherogramme nach Zugabe von Taurin untersucht. **Abbildung 4-3** zeigt ein typisches Elektropherogramm eines Hautextrakts. Zwischen Alanin und Glycin wurde Taurin detektiert. Zur Bestätigung des Peaks wurden die Hautextraktproben mit Taurin und Alanin aufgestockt. Der Vergleich der Elektropherogramme in **Abbildung 4-4** zeigt, dass sich durch das Aufstocken der Hautextraktprobe nur die Peakflächen von Taurin (**b**) und Alanin (**c**) vergrößerten. In keiner der untersuchten Proben wurden störende Substanzen detektiert, d.h. Taurin konnte eindeutig identifiziert werden. Der Taurin-Peak war kurz nach dem Alanin-Peak vorhanden, und partiell komigriert. Zur weiteren Optimierung der Trennung wurden zusätzliche Substanzen dem Laufpuffer hinzugesetzt, wie im Anschluss beschrieben ist.

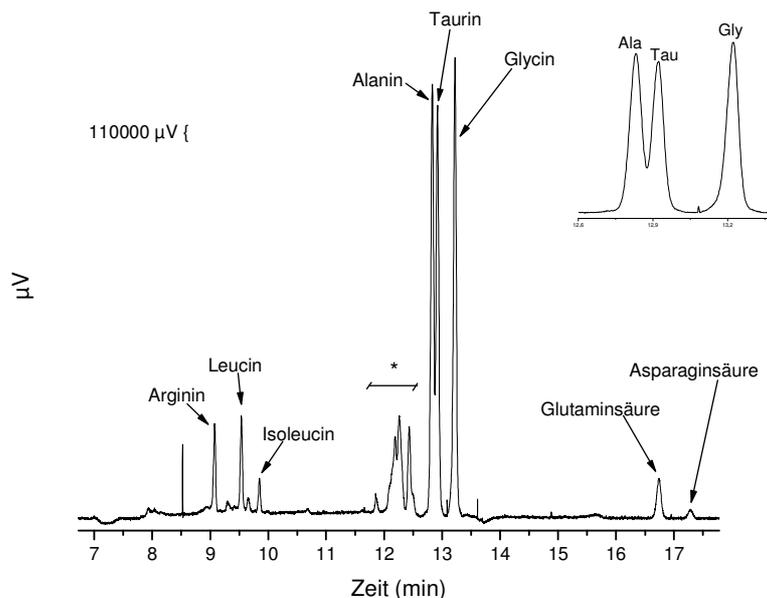


Abb. 4-3: Typisches Elektropherogramm eines Hautextraktes. Bedingungen: Boraxpuffer pH 10 (20 mM); wie **Abb. 4-1**.

*Alle anderen Aminosäuren, die nicht getrennt wurden.

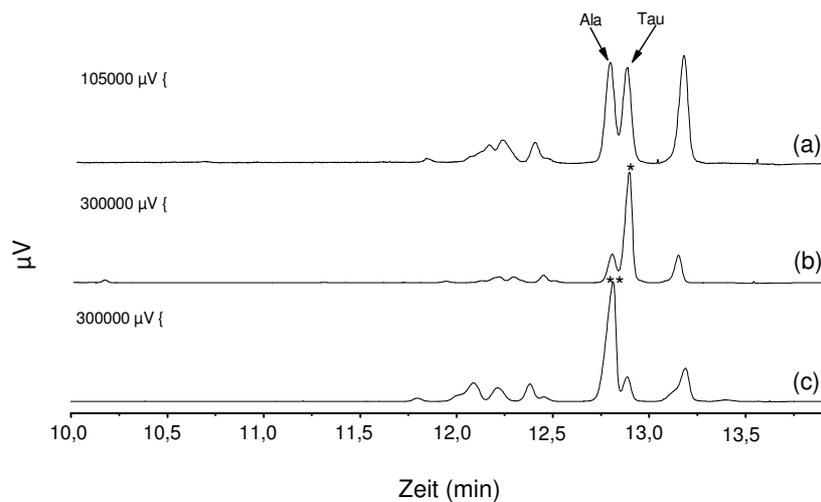


Abb. 4-4: Elektropherogramme von (a) Hautextrakt; (b) mit Taurin^{*} gespikten Hautextrakt (10:1 verdünnt mit Taurinlösung – 0,8 mM); und (c) mit Alanin^{**} gespikten Hautextrakt (10:1 verdünnt mit Alaninlösung – 0,8 mM). Bedingungen: wie **Abb. 4-1**.

Durch Zusatz von organischer Substanz (Pufferadditive) zum Laufpuffer kann die Selektivität des Systems verändert werden (Wätzig, 1998). Die Pufferadditive betrachtet man dabei als „pseudo-stationäre“ Phase, da die Probenbestandteile zwischen den Pufferadditiven und der durch Elektroosmose bewegten mobilen Phase verteilt werden. Zur erfolgreichen Trennung des Peaks wurden verschiedene Substanzen als Pufferadditive getestet. **Abbildung 4-5** zeigt den Einfluss von Pufferadditiven auf das Elektropherogramm des Hautextraktes. Hier wurden SDS, Brij[®]35 und β -Cyclodextrin hinzugefügt. Die erwünschte Selektivität des Taurin-Peaks wurde mit Hilfe von 998,8 $\mu\text{g/ml}$ β -Cyclodextrin (0,88 mM) erreicht. Durch Zugabe von β -Cyclodextrin hat die Peakauflösung (R_s , berechnete nach **Gleichung 11**) von 0,72 auf 2,27 zugenommen. Bei weiteren Erhöhungen der Konzentrationen (bis 40 mM) kam es zu einem ähnlichen Effekt auf die Peaktrennung. Durch den Zusatz von SDS und Brij[®]35 (je 40 mM) zur Pufferlösung ist allerdings ein unbefriedigender Effekt aufgetreten. Auch bei niedrigeren Konzentrationen (bis 10 mM) von SDS und Brij[®]35 hatte dies ähnliche Effekte zur Folge.

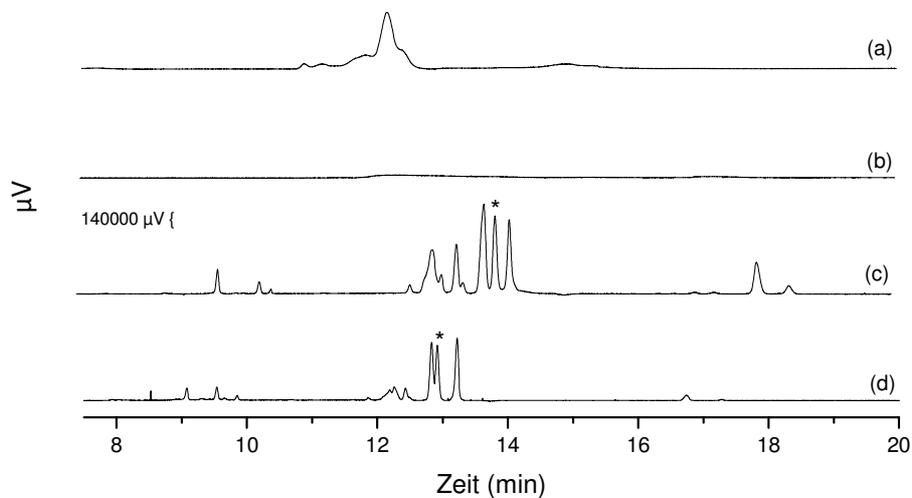


Abb. 4-5: Effekt des Pufferadditivs auf die Trennung des Taurin-Peaks in einer Hautextraktprobe: (a) SDS (40 mM); (b) Brij[®] 35 (40 mM); (c) β -Cyclodextrin (0,88 mM) und (d) ohne Pufferadditive. Bedingungen: wie **Abb. 4-1**.

*Taurin

Durch die Verwendung von 0,88 mM β -Cyclodextrin konnte Taurin-Peak auch in der Urinprobe getrennt detektiert werden (**Abbildung 4-6**). β -Cyclodextrin sorgte für eine bessere Peaktrennung ($R_s = 0,99$) und wurde daher eingesetzt. Im Gegensatz zu den Hautextrakt- und Urinproben, wurde die erfolgreiche Peaktrennung im Plasma nur durch Zusatz von 40 mM Brij[®]35 zum Laufpuffer erreicht (**Abbildung 4-7**). In Abhängigkeit der Pufferadditive und Matrix änderte Taurin seine Migrationszeit. Die Tatsache, dass sich nach Zugabe von β -Cyclodextrin die Migrationszeiten aller Analyten verlängert, ist ein Indiz dafür, dass Interaktionen zwischen den Analyten und β -Cyclodextrin stattgefunden haben. Da es sich um komplexe Proben (Hautextrakt, Urin und Plasma) handelt, können weitere Interaktionen zwischen Taurin, Matrices und Silanolgruppe an der Kapillarwand eintreten. Es wurden keine Komplikationen bei Validierung der Methode wegen der geänderten Migrationszeiten beobachtet.

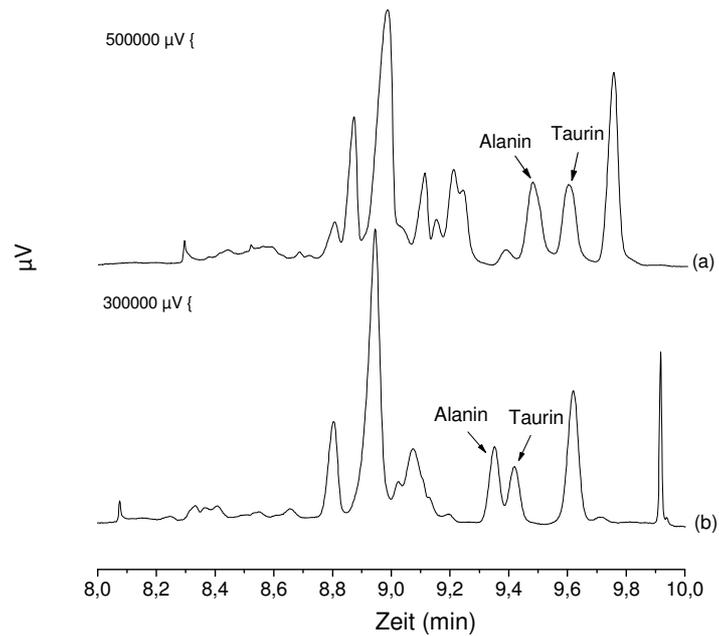


Abb. 4-6: Effekt des Pufferadditivs auf die Trennung des Taurin-Peaks in einer Urinprobe: (a) Boraxpuffer 20 mM (pH 10), 0,88 mM β -Cyclodextrin, $R_s = 0,99$ und (b) Boraxpuffer 20 mM (pH 10), $R_s = 0,77$. Bedingungen: wie **Abb. 4-1**.

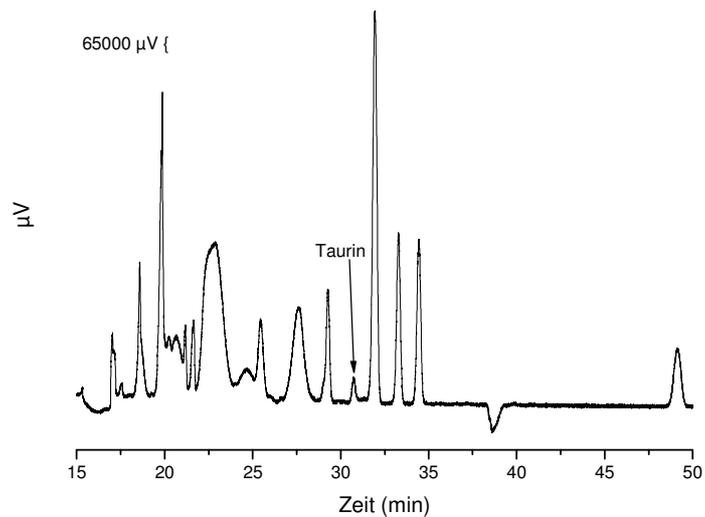


Abb. 4-7: Typisches Elektropherogramm einer Plasmaprobe. Boraxpuffer pH 10 (20 mM); 40 mM Brij[®]35; Bedingungen: wie **Abb. 4-1**.

Da der Taurin-Peak total getrennt war, konnte die Integration der Peakflächen mit hinreichender Genauigkeit durchgeführt werden um Taurin zu quantifizieren.

Präzision und Richtigkeit der Methoden

Die Verlässlichkeit eines analytischen Systems wird im wesentlichen durch die Begriffe Präzision und Richtigkeit beschrieben (The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products 1995). Die Präzision wird durch den relativen Variationskoeffizienten von mehreren Wiederholungsmessungen ein und derselben Probe bestimmt (Haeckel, 1980/1982). Man unterscheidet zwischen Serienpräzision (within-run-imprecision) und Präzision von Tag zu Tag (between-batch-imprecision). Aus den ausreißerfreien Werten wurde der relative Variationskoeffizient aus **Gleichung 13** berechnet.

Die Serienpräzision wurde sowohl unter Verwendung von Puffer als auch unter Verwendung von biologischen Proben als Matrices untersucht. Der **Tabelle 4-1** sind die jeweiligen Variationskoeffizienten zu entnehmen. Alle ermittelten Variationskoeffizienten (VK) lagen unter 1,0 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten biologischen Proben die Präzision der Methode nur unwesentlich beeinflusst.

Tab. 4-1: Serienpräzision der entwickelten Methode anhand der Variationskoeffizienten (VK), ($n = 5$).

Medium	VK (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer ¹	0,60	0,85	0,68
Hautextrakt ²	0,82	0,74	0,93
Plasma ³	0,71	0,94	0,67
Urin ⁴	0,45	0,93	0,58

Laufpuffer: ¹Boraxpuffer pH 10 (20 mM); ^{2,4} β -Cyclodextrin (0,88 mM); und ³Brij[®]35 (40 mM)

Die Präzision von Tag zu Tag gilt als Kriterium der Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum. Die berechneten Variationskoeffizienten der Präzision von Tag zu Tag sind in **Tabelle 4-2** aufgeführt. Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen zur Serienpräzision vergleichbar. Erwartungsgemäß war die Streuung der Messergebnisse im Rahmen der Präzision von Tag zu Tag größer.

Tab. 4-2: Präzision von Tag zu Tag der entwickelte Methode anhand der Variationskoeffizienten (VK), ($n = 5$).

Medium	VK (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer ¹	3,81	5,74	6,30
Hautextrakt ²	5,36	7,56	7,61
Plasma ³	4,73	9,45	5,98
Urin ⁴	8,66	8,03	9,51

Laufpuffer: ¹Boraxpuffer pH 10 (20 mM); ^{2,4}β-Cyclodextrin (0,88 mM); und ³Brij[®]35 (40 mM)

Zur Untersuchung der Richtigkeit wurden in vier verschiedenen biologischen Matrices an drei aufeinander folgenden Tagen für drei verschiedene Konzentrationen des Taurins vermessen. Die Richtigkeit wurde nach **Gleichung 15** berechnet. In folgenden **Tabelle 4-3** sind die Ergebnisse dargestellt.

Tab. 4-3: Richtigkeit der Methode ($n = 3$).

Medium	Richtigkeit (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer ¹	99,4	97,6	99,7
Hautextrakt ²	97,9	98,3	100,3
Plasma ³	101,5	102,1	105,2
Urin ⁴	105,9	104,9	103,7

Laufpuffer: ¹Boraxpuffer pH 10 (20 mM); ^{2,4}β-Cyclodextrin (0,88 mM); und ³Brij[®]35 (40 mM)

Die berechneten Konzentrationen wichen in allen Fällen um weniger als $\pm 8 \%$ von den Nominalwerten ab. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Methode hinsichtlich Präzision und Richtigkeit die Akzeptanzkriterien der FDA, wonach Variationskoeffizient und relativer Fehler nicht größer als 15% sein dürfen, erfüllt (FDA, 2001).

Wiederfindung des Taurins in den biologischen Proben

Die Wiederfindung im Vergleich zu 20 mM Boraxpuffer (pH 10) wurde anhand einer Probemischung, die mit fünf verschiedenen Konzentrationen des Taurins (**Tab 4-1**) versetzt wurde, bestimmt. Die prozentuale Wiederfindung (W) wurde nach **Gleichung 16** berechnet.

Die mittlere Wiederfindungsrate ($n = 3$) bezüglich der fünf untersuchten Taurin-Konzentrationen lag zwischen 110,27 (Plasma, 50 $\mu\text{g/ml}$) und 123,95 % (Plasma, 10 $\mu\text{g/ml}$), die absolute Abweichung (von 100 %) betrug somit in allen Fällen weniger als 7. Die Gesamtwiederfindungsrate (\bar{W}) betrug für Hautextrakt 116,89 %, für Plasma 115,58 % und für Urin 120,38 % (**Tab 4-4**).

Tab. 4-4: Wiederfindungsrate (W) des Taurins unter Verwendung verschiedener biologischen Matrices (jede, $n = 3$).

C_{zugesezt} ($\mu\text{g/ml}$)	W (%) Hautextrakt ¹	W (%) Plasma ²	W (%) Urin ³
50	113,73	110,27	120,17
25	116,95	113,01	121,24
16,7	117,73	110,51	120,06
10	117,42	123,95	122,49
3	118,60	120,16	117,92
\bar{W}^* (%)	116,89	115,58	120,38
s	1,89	6,16	1,69
VK (%)	0,72	2,38	0,63

* Gesamtwiederfindungsrate ($n = 15$)

Die Versuche zur Wiederfindung verdeutlichen, dass 20 mM Boraxpuffer (pH 10) ein geeignetes Medium zur Kalibrierung ist.

Linearität

Da die Ergebnisse der Wiederfindung zeigten, dass sich Puffer zur Kalibrierung eignet, wurden die Untersuchungen zur Linearität unter Verwendung von 20 mM Boraxpuffer (pH 10) durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden ausgewertet. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-5** zusammengefasst. **Abbildung 4-8** zeigt eine typische Kalibriergerade, die durch eine lineare Regression (gewichtet $1/x^2$) erhalten wurde.

Tab. 4-5: Daten der Kalibrierungsgeraden des Taurins.

	Boraxpuffer (pH 10, 20 mM)	β -Cyclodextrin (0,88 mM)	Brij [®] 35 (40 mM)
Konzentrationsbereich (mol/l)	8×10^{-7} - $1,6 \times 10^{-3}$	8×10^{-8} - $1,6 \times 10^{-3}$	8×10^{-6} - $1,5 \times 10^{-3}$
r^*	0,9945	0,9993	0,9961
Migrationszeit (min)	13,34	14,85	26,05
RSD ^{**} (%) der Migrationszeit ($n = 5$)	2%	1%	2%

*Korrelationskoeffizient

**Relative Standardabweichung

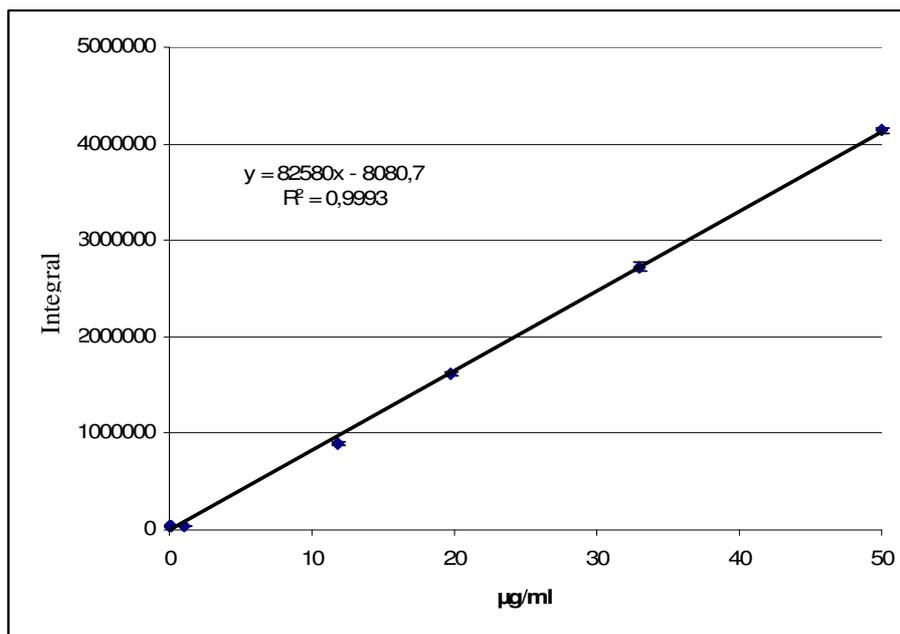


Abb. 4-8: Typische Kalibriergerade des Taurins in 20 mM Boraxpuffer pH 10 (0,88 mM β -Cyclodextrin)

Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Als Bestimmungsgrenze (Lower Limit of Quantification, LLOQ) wurde für Taurin eine Konzentration von 0,8 μM in Boraxpuffer (pH 10, 20 mM), 0,08 μM in Boraxpuffer mit 0,88 mM β -Cyclodextrin und 8,0 μM in Boraxpuffer mit 40 mM Brij[®]35 ermittelt. **Tabelle 4-6** zeigt die Daten zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ. Sie demonstrieren, dass das jeweilige LLOQ mit hinreichender Präzision und Richtigkeit erfasst werden konnte.

Die Nachweisgrenze (LOD) des Taurins wurde in drei unterschiedlichen Medien bestimmt. Pro Probe wurde jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die ermittelten LODs des Taurins in Boraxpuffer und in dem Boraxpuffer mit 0,88 mM β -Cyclodextrin lagen im picomolaren Bereich. Der Boraxpuffer mit 40 mM Brij[®]35 lag im micromolaren Bereich.

Tab. 4-6: LLOQ inklusive Daten zur Präzision und Richtigkeit sowie LODs des Taurins in drei unterschiedlichen Medien.

	Boraxpuffer (pH 10, 20 mM)	β-Cyclodextrin (0,88 mM)	Brij[®]35 (40 mM)
LLOQ (μM) (n = 5)	0,8	0,08	8,0
Präzision, VK (%)	10,7	6,38	15,91
Richtigkeit (%)	106,9	113,4	110,1
LOD (pM) (n = 6)	23	7,5	0,33*

* μM

4.2 ENTWICKLUNG DER CE-METHODE – ELEKTROCHEMISCHER DETEKTOR

Zur Vermeidung des Derivatisierungsschrittes, wie es bei fluorimetrischem Detektor gefordert ist, wurde eine andere Methode für die Taurinbestimmung für die biologischen Proben entwickelt. Da Taurin ein elektroaktives Analyt ist, kann es mit Hilfe eines elektrochemischen Detektors ohne Derivatisierung detektiert werden.

VALIDIERUNG DER METHODE

pH-Abhängigkeit und Selektivität

Zur Optimierung der Trennung des Taurin-Peaks wurde der pH-Wert so variiert, dass eine höhere Peakauflösung (R_s) erzielt werden konnte. Zu Beginn wurde die pH-Abhängigkeit der Trennung mit vier verschiedenen pH-Werten untersucht. **Abbildung 4-9** stellt das typische Elektropherogramm des Hautextrakts in Abhängigkeit vom pH-Wert des Laufpuffers dar. Mit steigendem pH-Wert ist die Peakauflösung (R_s , **Gleichung 11**) verbessert. Die erfolgreiche Trennung des Taurin-Peaks wurde bei pH 11 erreicht. Bei einem pH-Wert von 11 ist die höchste Peakauflösung ($R_s = 3,7$) zu verzeichnen. Diese nimmt bei einem pH-Wert von 10 ab ($R_s = 0,8$).

Der Taurin-Peak wurde in die biologischen Proben durch die Zugabe des Taurins bestätigt. **Abbildung 4-10** zeigt beispielsweise das Elektropherogramm des Hautextrakts, dessen Probe mit Taurin aufgestockt wurde. Eine befriedigende Trennung des Taurin-Peaks wurde auch bei pH 11 für die Schweiß-, Plasma- und Urinproben gefunden (**Abbildungen 4-11, 4-12 und 4-13**).

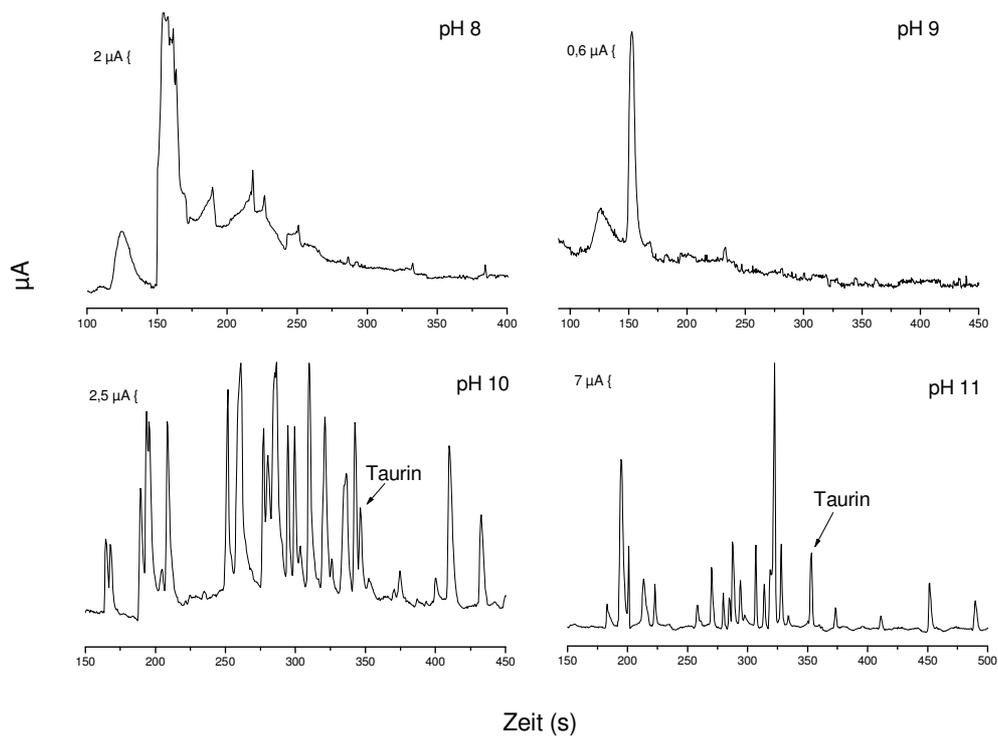


Abb. 4-9: Einfluss von pH-Wert auf das Elektropherogramm des Hautextraktes.
 Bedingungen: 20 mM Boraxpuffer; 21,5 KV Spannung; 10 s Injektionszeit (hydrostatische Injektion); Kapillare: 50 μm Durchmesser; 65 cm Länge insgesamt.

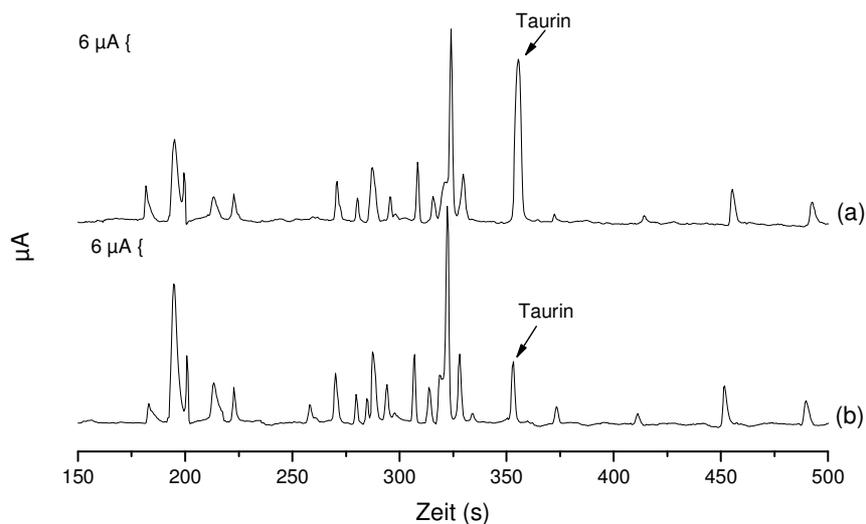


Abb. 4-10: Elektropherogramm von einer mit Taurin (a) gespikten Hautextraktprobe und (b) eine Hautextraktprobe. Bedingungen: wie **Abb. 4-9**.

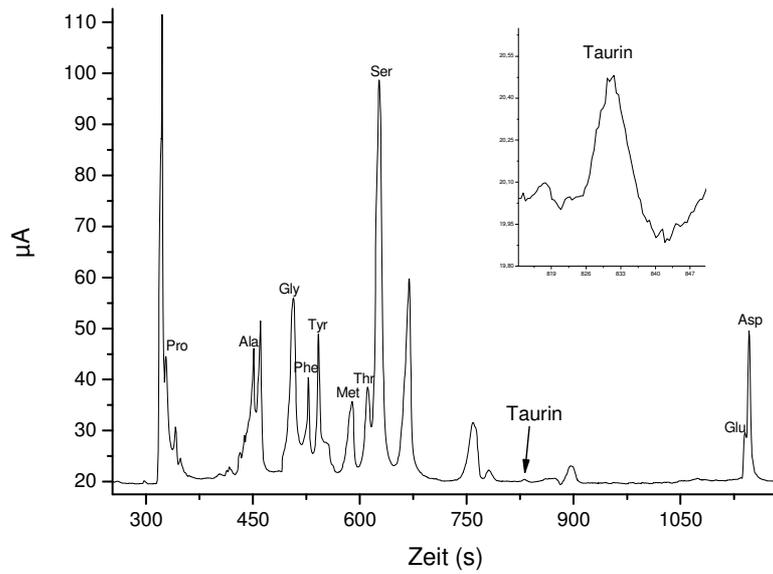


Abb. 4-11: Typisches Elektropherogramm einer Schweißprobe. Bedingungen: wie **Abb. 4-9**, außer: Kapillare von 81 cm Länge insgesamt.

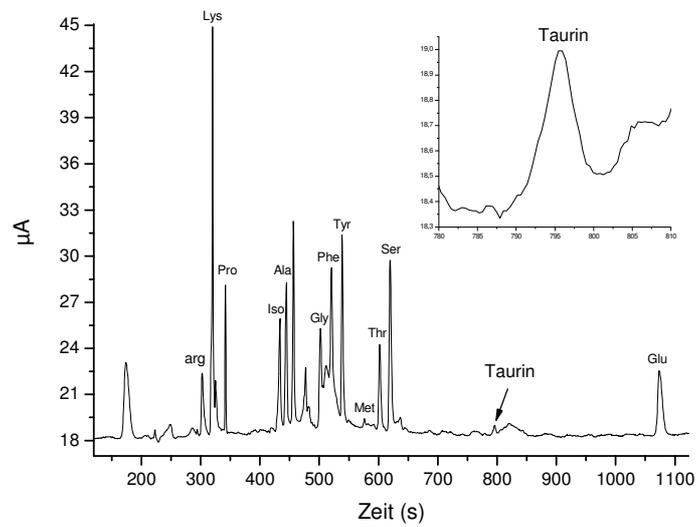


Abb. 4-12: Typisches Elektropherogramm einer Plasmaprobe. Bedingungen: wie **Abb. 4-9**, außer: Kapillare von 81 cm Länge insgesamt.

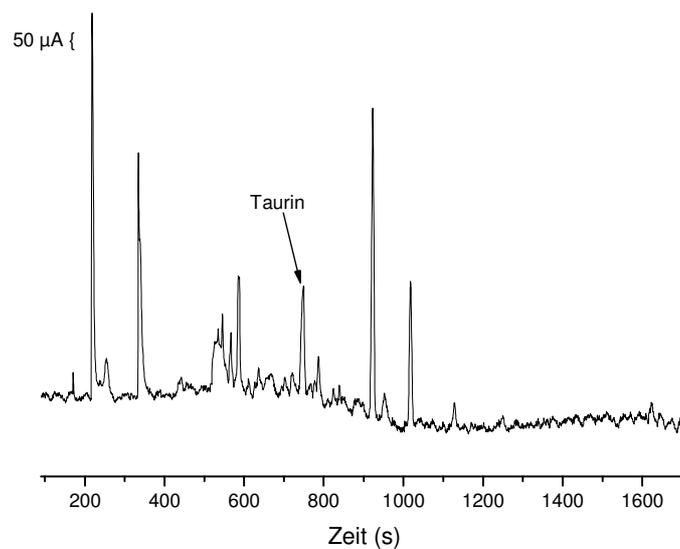


Abb. 4-13: Typisches Elektropherogramm einer Urinprobe. Bedingungen: wie **Abb. 4-9**, aber: Kapillare von 81 cm Länge insgesamt.

Präzision und Richtigkeit der Methoden

Die Präzision wurde als Vergleichspräzision durch fünfmalige Herstellung der Taurinlösung pro Konzentrationsstufe auf drei verschiedenen Konzentrationsebenen ermittelt. Zusätzlich wurden diese Bestimmungen an einem zweiten Tag wiederholt und mit den Werten des ersten Tages verglichen. Mit Hilfe der Kalibrierfunktion wurde ein durch Messung ermittelter Konzentrationswert für jede Untersuchungslösung bestimmt. Die Serienpräzision wurde sowohl unter Verwendung von Puffer als auch unter Verwendung von biologischen Proben als Matrices untersucht. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-7** dargestellt. Alle ermittelten Variationskoeffizienten lagen unter 11 %. Die Ergebnisse zeigen, dass die verwendeten biologischen Proben die Präzision der Methode unwesentlich beeinflussen.

Tab. 4-7: Serienpräzision der entwickelten Methode anhand der Variationskoeffizienten (VK), ($n = 5$).

Medium	VK (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer	7,50	6,16	5,68
Hautextrakt	10,57	7,74	9,43
Plasma	7,82	7,17	8,01
Urin	5,78	7,34	6,47
Schweiß	8,55	7,42	5,33

Laufpuffer: Boraxpuffer pH 11 (20 mM)

Die berechneten Variationskoeffizienten der Präzision von Tag zu Tag sind in **Tabelle 4-8** aufgeführt. Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen zur Präzision von Tag zu Tag vergleichbar. Erwartungsgemäß war die Streuung der Messergebnisse im Rahmen der Präzision von Tag zu Tag größer.

Tab. 4-8: Präzision von Tag zu Tag der entwickelten Methode anhand der Variationskoeffizienten (VK), ($n = 5$).

Medium	VK (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer	8,65	9,29	8,93
Hautextrakt	14,02	13,92	14,31
Plasma	12,42	15,30	13,49
Urin	13,34	16,12	15,08
Schweiß	9,31	11,04	12,95

Laufpuffer: Boraxpuffer pH 11 (20 mM)

Die Prüfung auf Richtigkeit erfolgte an zwei Tagen für jeweils drei verschiedene Konzentrationen des Taurins in fünf verschiedenen Medien. **Tabelle 4-9** ist zu entnehmen, dass die Richtigkeit des elektrochemischen Detektors den gestellten Anforderungen genüge, wonach die prozentuale Abweichung zwischen der berechneten Konzentration und der Nominalkonzentration maximal 15 % betragen darf.

Tab. 4-9: Richtigkeit der Methode ($n = 3$).

Medium	Richtigkeit (%)		
	10 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Boraxpuffer	99,10	96,46	88,91
Hautextrakt	92,46	113,92	109,21
Plasma	110,76	114,99	110,65
Urin	111,31	113,78	97,30
Schweiß	108,25	101,88	114,97

Laufpuffer: Boraxpuffer pH 11 (20 mM)

Wiederfindung (\bar{W})

Die Wiederfindung wurde anhand einer Mischung von vier verschiedenen biologischen Proben ($n = 3$), die mit unterschiedlichen Konzentrationen an Taurin gespickt wurden, untersucht (**Tabelle 4-10**). Die jeweilige Wiederfindungsrate wurde nach **Gleichung 16** berechnet.

Die Ergebnisse der **Tabelle 4-10** verdeutlichen, dass die Wiederfindung jeweils reproduzierbar war (die Variationskoeffizienten der Gesamtwiederfindungsrate (\bar{W}) lagen zwischen 2,78 und 7,07 %). Kalibrierungen in den Matrices waren somit nicht notwendig.

Tab. 4-10: Wiederfindungsrate (W) des Taurins unter Verwendungen von verschiedenen biologischen Matrices (jede, $n = 3$).

C_{zugelegt} (µg/ml)	W (%) Hautextrakt	W (%) Schweiß	W (%) Plasma	W (%) Urin
100	102,30	93,13	88,06	115,26
50	101,96	97,61	96,94	96,90
25	95,38	73,27	102,15	97,45
10	92,89	84,98	77,56	121,53
\bar{W}^* (%)	98,13	87,25	91,18	107,80
s	4,73	10,68	10,78	12,51
VK (%)	2,78	7,07	6,83	6,70

* Gesamtwiederfindungsrate ($n = 12$)

Linearität

Da die Ergebnisse der Wiederfindung zeigten, dass sich der Puffer zur Kalibrierung eignet, wurden die Untersuchungen zur Linearität unter Verwendung von 20 mM Boraxpuffer (pH 11) durchgeführt. Insgesamt wurden sechs Kalibriergeraden ausgewertet. Bei der Gehaltsbestimmung ist es üblich, den Bereich von 50 bis 150 % der nominellen Gehaltsbestimmungskonzentration als Bereich festzulegen, innerhalb dieses Bereiches wird die Linearität des elektrochemische-Detektorsignals zur Konzentration des Taurins geprüft. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 4-11** zusammengefasst. **Abbildung 4-14** zeigt die Linearitätsgerade von Taurin.

Tab. 4-11: Daten der Kalibrierungsgeraden des Taurins.

	Boraxpuffer (pH 10, 20 mM)
Konzentrationsbereich (mol/l)	$4 \times 10^{-5} - 4 \times 10^{-3}$
r^*	0,9909
Migrationszeit (s)	564,81
RSD ^{**} (%) der Migrationszeit ($n = 5$)	1,35

*Korrelationskoeffizient

**Relative Standardabweichung

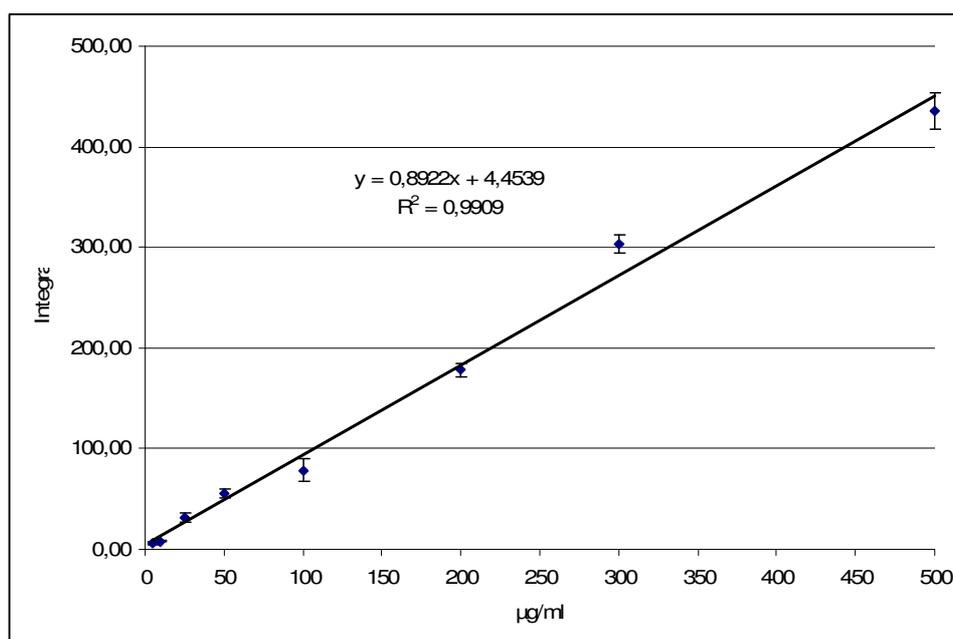


Abb. 4-14: Linearität der Kalibriergeraden des Taurins in Boraxpuffer pH 11 (20 mM).

Nachweisgrenze / Bestimmungsgrenze

Die niedrigste Konzentration (Bestimmungsgrenze, LLOQ), die mit hinreichender Präzision und Richtigkeit bestimmt werden konnte, betrug jeweils 40 µM. Der **Tabelle 4-12** sind die Daten zur Präzision und Richtigkeit bezüglich des LLOQ zu entnehmen.

Die Nachweisgrenze (LOD), ermittelt anhand eines Signal-Rausch-Verhältnisses von 3, lag bei 1 µM.

Tab. 4-12: LLOQ inklusive Daten zur Präzision und Richtigkeit sowie LODs des Taurins.

	Boraxpuffer (pH 10, 20 mM)
LLOQ (µM) (n = 5)	10
Präzision, VK (%)	7,8
Richtigkeit (%)	106,9
LOD (µM) (n = 6)	1

4.3 QUANTIFIZIERUNG DES TAURINS IN VERSCHIEDENEN BIOLOGISCHEN PROBEN

Die Quantifizierung des Taurins in verschiedenen biologischen Proben erfolgte mittels CE-Methoden. **Tabelle 4-13** stellt der Vergleich von zwei unterschiedlichen Detektionsverfahren dar. Da kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Taurinkonzentration zwischen beiden Detektoren beobachtet wurde, sind die Detektoren äquivalent. Die gemessenen Tauringehalte in verschiedenen Proben sind bei fluorimetrischen bzw. elektrochemischen Detektoren vergleichbar mit anderen Autoren (Stein, 1954; Wahren, 1972; Gitlitz, 1974; Liappis, 1975; Liappis 1979; Liappis, 1980; Smeraldi, 1987; Filho, 1997; Mauri, 1998; Pouw, 1998; Forslund, 2000).

Tab. 4-13: Tauringehalt in verschiedenen biologischen Proben.

Biologische Proben	Taurin ($\mu\text{mol/l} \pm \text{S.D.}$)	
	FD ¹	ED ²
Hautextrakt ($n = 12$)	$0,88 \pm 0,1^3$	$0,78 \pm 0,28^3$
Plasma ($n = 7$)	$35,13 \pm 0,85$	$40,18 \pm 4,1$
Urin ($n = 4$)	$837,43 \pm 3,0$	$824,1 \pm 20,2$
Schweiß ($n = 10$)	-	$13,67 \pm 6,87$

¹Fluorimetrischer Detektor

²Elektrochemischer Detektor

³ $\mu\text{mol/g}$ Frischgewebe

4.4 LIBERATIONS- UND PENETRATIONSVERHALTEN

4.4.1 Mehrschichtmembranmodell (MSMM)

Das Liberationsverhalten von Taurin aus Basiscreme DAC wurde mit dem Mehrschichtmembranmodell nach der in **Kap. 3.8.1** beschriebenen Methode untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 4-15** dargestellt.

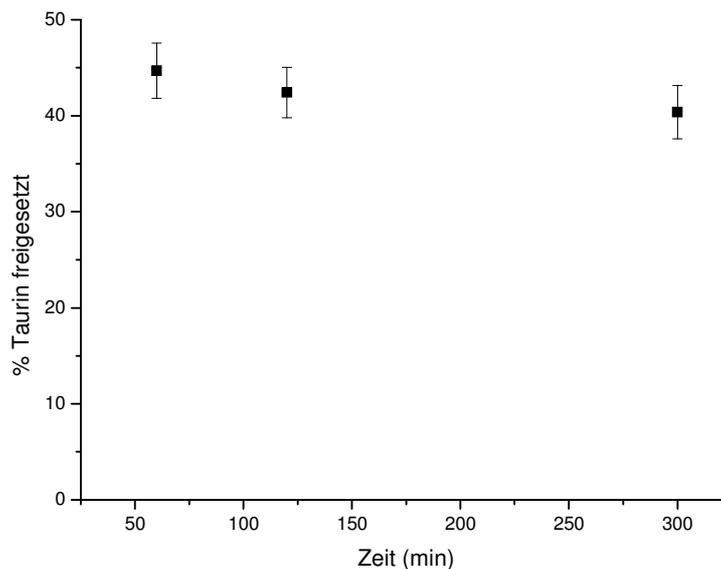


Abb. 4-15: Freisetzung des Taurins aus 1%iger Basiscreme im Mehrschichtmembranmodell.

Aus der **Abbildung 4-15** wird deutlich, dass initial keine verzögerte Freisetzung aus Basiscreme zu beobachtet war. Innerhalb von 60 min wurden 44,69 % \pm 2,89 des Taurins, bezogen auf die applizierte Dosis, in den Akzeptor (4 Membranen) diffundiert, die jedoch nicht weiter ansteigt (120 und 300 min). Die Liberation des Taurins aus Basiscreme DAC war im Untersuchungszeitraum von der Zeit unabhängig ($p > 0,05$) und auf einen Maximalwert von ca. 42 % beschränkt. Basiscreme DAC ist eine amphiphile Formulierung, in der sich Taurin in der äußeren Phase dieser Creme befindet und somit direkt in den Akzeptor diffundieren kann. Die Bedeutung des “solvent drag”-Effekt für Diffusion des Taurins in den Membranakzeptor ist ganz wichtig.

Die Verteilung des Taurin auf dem Akzeptor ist in der **Abbildung 4-16** dargestellt. Ca. 17,63 % \pm 2,17 wurden nach 60 min in der ersten Membran detektiert. Bei weiteren Versuchen

zeigten sich keine signifikanten Änderungen ($p > 0,05$) der Verteilung, somit ist die Verteilung unabhängig von der Zeit.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Taurin aus Basiscreme DAC ausreichend freigesetzt wird. Die Freisetzungsrates betrug nach 300 min höchstens ca. 40 %. Demnach ist die Freisetzung der limitierende Schritt für eine sich anschließende Penetration.

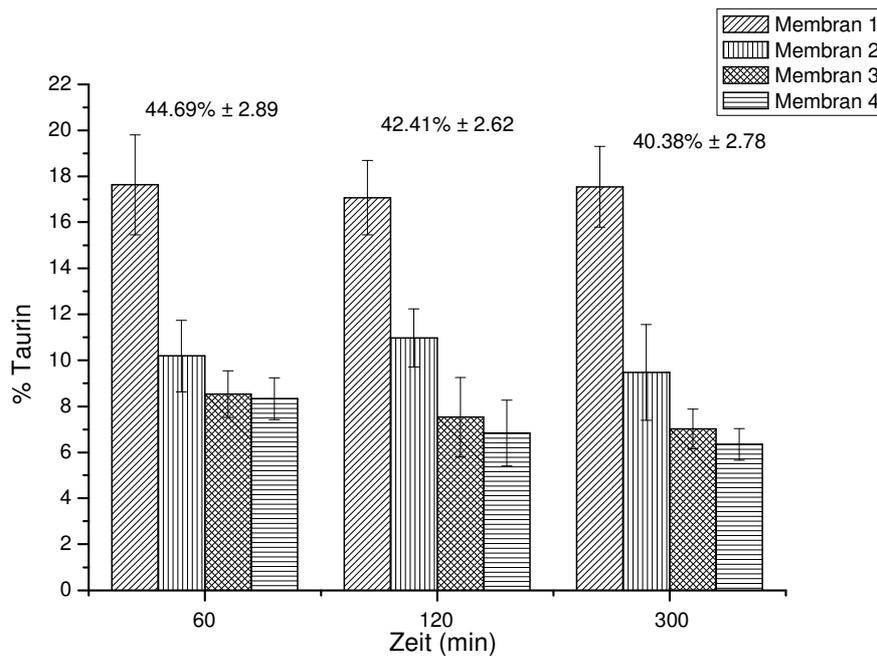


Abb. 4-16: Liberation des Taurins aus 1%-iger Basiscreme DAC und seine Verteilung in den Glycerol-Membranen.

4.4.2 Diffusionszelle nach Franz

In den folgenden Abbildungen werden die Resultate des nativen Taurinspiegels in jeder exzidierte Humanhautschicht im Vergleich zu dem Tauringehalt nach ein- u. fünfstündigen Penetrationsversuchen aus 1 %iger taurinhaltiger Basiscreme DAC graphisch dargestellt (**Abbildung 4-17**).

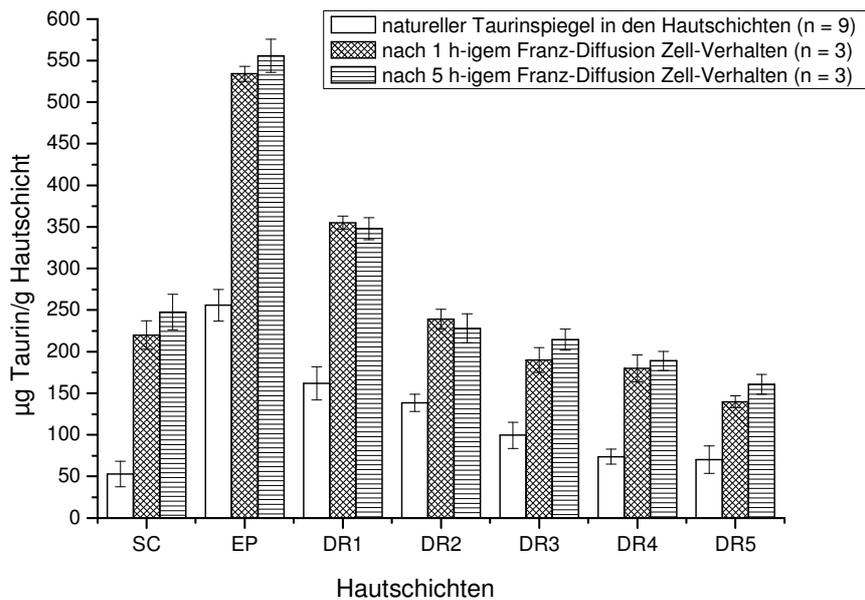


Abb. 4-17: Penetration des Taurins ($\mu\text{g Taurin/g Hautschicht}$) in exzidierte Humanhaut ($\bar{x} \pm SD$); SC = Stratum corneum, EP = Epidermis, DR1-5 = Dermischnitte.

Grundsätzlich ist Taurin nicht gleichmäßig in den Hautschichten verteilt. Da die Epidermiszelle, wie der Keratinocyt, ein Taurindepot darstellt, wurde die höchste Konzentration für jeden Versuchszeitpunkt in dieser Hautschicht detektiert. Aufgrund seiner ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften besitzt Taurin eine schwache Affinität zum Stratum corneum und zur Dermis. Die Verteilungsprofile des Taurin in verschiedenen Hautschichten sind identisch zu allen Versuchszeitpunkten, so dass in keiner Hautschicht ein zeitabhängiger Anstieg (1 und 5 h) der Taurinkonzentration beobachtet werden konnte. Der Konzentrationsgradient zwischen SC, EP und DR1-4 bleibt über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. Das bedeutet, dass neben der Depotbildung in der Epidermis auch ein kontinuierlicher Abtransport des Taurins in die lipophilere Dermis erfolgt. In allen Hautschichten ist nach der Applikation der Formulierung eine signifikante deutliche Erhöhung ($p < 0,05$) der Konzentration im Vergleich zu dem natürlichen Taurinspiegel zu beobachten. Jedoch wurde kein statistischer Unterschied der Taurinkonzentration in der Hautschicht ($p > 0,05$) zwischen Versuchszeit (1 und 5 h) nach dem Franz-Diffusion Zelle-Versuch beobachtet. Taurin war im Akzeptor nach 1 h in hoher Menge messbar, die ca. 27 % ($53,62 \mu\text{g} \pm 1,12$) der gesamten eingesetzten Menge entsprach. Nach längerer Zeit (5 h) wurde die Taurinmenge auf ca. 39 % ($77,62 \mu\text{g} \pm 1,63$) im Akzeptor erhöht (**Abbildung 4-18**).

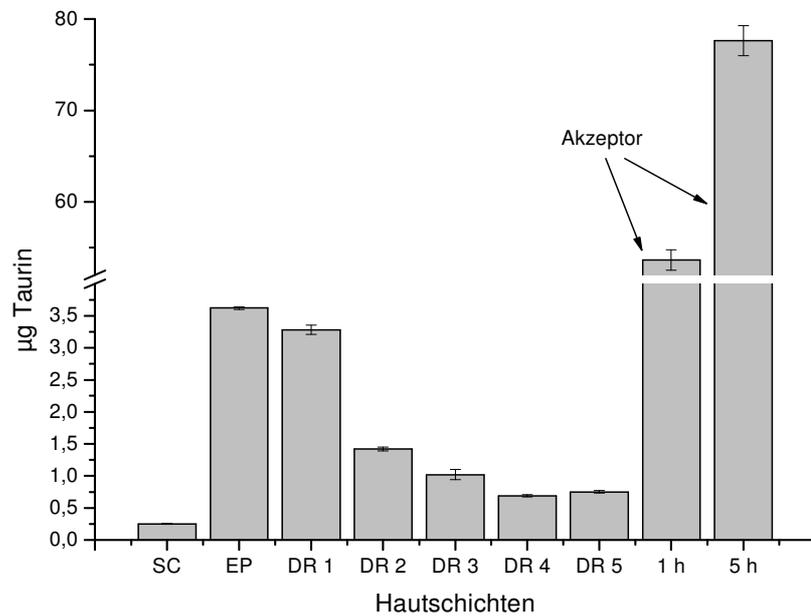


Abb. 4-18: Taurinmenge (μg) in den Hautschichten im Vergleich zu den Akzeptoren.

Anhand der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Untersuchungen ist ersichtlich, dass die amphiphile Formulierung Basiscreme DAC für die topische Applikation des Taurins geeignet ist. In Penetrationsstudien an exzidiierter Humanhaut mit 1 %iger Taurin-haltiger Basiscreme DAC war eine Depotbildung in der Epidermis und in oberem Dermis zu beobachten.

4.5 HÜHNEREI-TEST

Als Negativkontrollen wurde Taurin beobachtet. Zeigt die zu Taurin (2 % in Phosphatpuffer) an der CAM keine Reaktion, gilt der Test als „bestanden“. Reizungen, deren Auftreten über das Nervensystem bedingt ist, sind über den HET-Test allerdings nicht vorhersagbar.

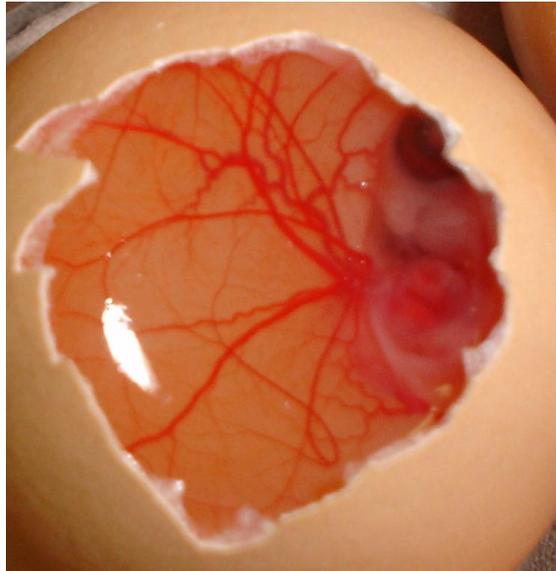


Abb. 4-19: HET-Test unmittelbar nach Einwirkung von Taurin (2 % in Basiscreme DAC).

5 DISKUSSION

Im Folgenden werden die in Kapitel 4 aufgeführten Ergebnisse diskutiert.

5.1 KAPILLARELEKTROPHORESE

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass zwei empfindliche Detektoren zur Taurinbestimmung in verschiedenen biologischen Matrices möglich sind. Es ergaben sich aber auch neue Ansätze, die Technik in der Kapillarelektrophorese zu verbessern. Durch die elektrochemischen bzw. fluorimetrischen Detektoren konnte so Taurin deutlich in biologischen Matrices gemessen werden.

5.1.1 Methodenentwicklung

Im ersten Teil der Arbeiten wurde die vorhandene Detektoren erprobt. Dabei stand nicht unmittelbar die Analyse von biologischen Proben im Vordergrund, sondern es sollte getestet werden, welche Untersuchungsmöglichkeiten die Geräte am Beispiel des Taurin bieten.

In der Literatur finden sich zahlreiche Definitionen, was unter dem Begriff bzw. dem Verfahren einer Validierung zu verstehen ist (Kromidas, 1999). Diese Definitionen sind nicht alle allgemeingültig, sondern resultieren zum Teil aus den zugrundeliegenden Anwendungen. Eine allgemeingültige Beschreibung ergibt sich aus der ISO-Norm 8402: „Die Validierung ist die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt werden“.

Da es sich bei dem beabsichtigten Einsatzfeld um eine bioanalytische Fragestellung handelt, erfolgt die Ermittlung der entsprechenden Parameter in Anlehnung an eine Richtlinie, die von der Food and Drug Administration (FDA) für bioanalytische Analysenverfahren herausgegeben wurde. Hier ist festgelegt, welche Kriterien mit welchen Fehlergrenzen an eine bioanalytische Methode angelegt werden sollen. Entsprechend den Vorgaben der FDA für bioanalytische Methode erfolgte für die eingesetzte Methode eine Validierung.

Fluorimetrischer Detektor

Um auch sehr niedrige Konzentrationen des Taurins in den komplexen Matrices nachzuweisen, und da Taurin keine Chromophorgruppe hat, wurde Taurin mit einem

Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescamin) markiert und die Derivate durch die energiereiche Hauptspektrallinie (495 nm) eines Argon-Lasers angeregt. Als Fluoreszenzmarker wurde Fluorescamine eingesetzt, da es gegenüber primären Aminen eine hohe Reaktivität und Selektivität aufweist und die gebildeten Produkte über eine hohe Stabilität verfügen. Das für die Trennung des Taurins in verschiedenen biologischen Matrices entwickelte System besteht aus einem alkalischen Trennelektrolyten (Boraxpuffer pH 10, 20 mM) mit einem Zusatz von 40 mM des neutralen mizellbildenden Emulgators Brij[®]35 (Plasma), von 0,88 mM β -Cyclodextrin (Hautextrakt und Urin). Die Pufferadditive dienen der Auftrennung des Taurins, da Taurin sowie anderen Substanzen der Matrices unterschiedliche Affinität zu den Mizellen bzw. β -Cyclodextrin hat und somit getrennt werden können. Um die Selektivität des Taurinspeaks im Plasma zu erhöhen und die Wandadsorption der in den Proben vorkommenden Substanzen zu reduzieren, wurde die mizellare elektrophoretische Chromatographie auf ihre Tauglichkeit zur Trennung des Taurins untersucht. Zu diesem Zweck wurde das ungeladene Tensid Brij[®]35 eingesetzt. Es zeigte sich, dass bei der Zugabe von Brij[®]35 zum Laufpuffer hat eine Beeinträchtigung für Nachweis des Taurins im Plasma verursacht. Brij[®]35 sollte einerseits als Mizellenbildner dienen, andererseits die Kapillarwand dynamisch beschichten.

Zu den Parametern, deren Einfluss auf die Trennbarkeit zu Optimierungszwecken in dieser Arbeit untersucht wurde, gehörten der pH-Wert, Pufferadditive, Konzentration von Pufferadditiven und die Ionenstärke des Boraxpuffers. Der Einfluss des pH-Wertes beim Transport des Taurins zum Detektor kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Bei schwachen Säuren und Basen bewirkt die Variation des pH-Wertes die größten Mobilitätsänderungen, da der Dissoziationsgrad die effektive Mobilität bestimmt. Die elektrophoretische Migration wird meistens durch die Dissoziation der Silanolgruppen der Kapillarwand beeinflusst. Durch pH-Änderungen wird aber neben der elektrophoretischen Mobilität auch die elektroosmotische Mobilität verändert, da das ζ -Potential pH-abhängig ist. Ein höherer EOF führt zu kürzeren Analysenzeiten (im katodischen Modus), aber auch zu einer geringeren Auflösung für Kationen und für Anionen. Durch Herabsetzung des pH-Wertes des Laufpuffers hat sich die Trennung des Taurins verschlechtert.

Die sehr gute Seriepräzision und die Präzision Tag zu Tag ist bei dieser Methode auf die hohe Stabilität des derivatisierten Fluorophors zurückzuführen. Im Rahmen der Methodenentwicklung konnte die Trennung des derivatisierten Taurins effizient durch die

Verwendung der 0,88 mM β -Cyclodextrin (Urin und Hautextrakt) und 40 mM Brij[®]35 (Plasma) im Laufpuffer (20 mM, pH 10) optimiert werden.

Elektrochemischer Detektor

Da die Kapillarelektrophorese eine Trenntechnik ist, welche hauptsächlich auf der unterschiedlichen Mobilität verschiedener Ionen beruht, ist eine der wichtigsten Fehlerquellen die Stromversorgung. Zunächst muss überprüft werden, ob die in der Analysenmethode vorgegebenen Parameter für Spannung, Stromstärke oder elektrische Feldstärke richtig eingestellt sind.

Für einen Stromzusammenbruch können z. B. Luftblasen die Ursache sein. Zur Behebung des Problems kann die Kapillare neu befüllt werden, wodurch in ihr vorhandene Luftblasen herausgedrückt werden. Sollte das Problem weiterhin auftreten, ist entweder von einer verstopften Kapillare auszugehen, oder das Injektionssystem funktioniert nicht richtig. Zunächst kann versucht werden, die Kapillarenden nachzuschneiden. Falls die Kapillare gebrochen ist, muss die Kapillare durch eine neue ersetzt werden. Die richtige Funktion des Injektionssystems kann dann durch Austausch der Kapillare und Durchspülen mit einer Lösung (Fluoresceinlösung), die ein Detektorsignal erzeugt, überprüft werden. Ein weiteres Problem kann darin bestehen, dass eine zu lange Zone an Probe niedriger elektrischer Leitfähigkeit injiziert wird. Dies kann durch ein Herabsetzen der Injektionszeit, höheren Probenkonzentration oder elektrokinetische Injektion vermieden werden. Zunächst muss, wie zuvor erwähnt, die korrekte Einstellung sämtlicher Parameter wie Spannung, Wellenlänge, Temperatur und natürlich der Injektionsparameter überprüft werden. Auch muss die richtige Position von Puffer- und Probengefäßen kontrolliert werden. Um die Methode so empfindlich wie möglich zu gestalten, wurden die optimalen Trennsbedingungen für jede biologische Probe (Hautextrakt, Schweiß, Plasma und Urin) ermittelt. Mit diesen Maßnahmen wurde, für Taurin, ein Nachweisgrenze (LOD) von 1 μ M erzielt. Die untere Bestimmungsgrenze (LLOQ) wurde bei 10 μ M festgelegt.

5.1.2 Vergleich zwischen fluorimetrische und elektrochemische Detektor

Im Zuge dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine sehr empfindliche Detektion von Taurin im Hautextrakt, im Urin, im Plasma und im Schweiß möglich ist. Sowohl für den fluorimetrischen Detektor als auch für den elektrochemischen Detektor zeigte die Präzision

Tag zu Tag deutlich größer als die Seriepräzision. Im Vergleich zu dem elektrochemischen Detektor besitzt der fluorimetrischen Detektor eine höher Wiederholpräzision sowie eine geringer Bestimmungs- bzw. Nachweißgrenze. Durch die Derivatisierung des Taurins mit Fluorescamin eine sehr gute Empfindlichkeit (LOD = 7,5 pM) nachgewiesen wird. Bei dem elektrochemischen Detektor ist die Nachweißgrenze höher (LOD = 1 µM), aber Taurin konnte ohne Derivatisierung in den biologischen Matrices bestimmt werden. Das nicht automatisierte elektrochemische Detektor-System wurde in unserem Labor aufgebaut, es ist noch nicht kommerziell verfügbar.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die beide kapillarelektrophoretische Methode zur Bestimmung von Taurin entwickelt und nach international anerkannten Kriterien validiert wurde.

5.2 TAURINSPIEGEL IN DEN VERSCHIEDENEN BIOLOGISCHEN PROBEN

Die physiologischen Schwankungsbereiche der Taurinkonzentrationen sind sowohl im Urin als auch im Schweiß beträchtlich (**Tabelle 5-14**). Im Plasma dagegen ist die Taurinspiegel relativ konstanter. Diese Variabilität des Taurinspiegels im Urin und im Schweiß ist auf die unterschiedlichen Urinmengen und Schweißflußraten, die bei Einflüssen wie die Einnahme von Hormonen und des Geschlechtes auftreten können, zurückzuführen (Liappis, 1980). Die Taurinkonzentration im Schweiß kann eine Reihe signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Körperpartien haben (Liappis, 1975). Von Bedeutung ist hier die Verteilung der Anzahl der Akkrinen Schweißdrüsen auf die einzelnen Körperpartien. In der vorliegenden Studie wurde die Taurinmenge im Schweiß an der Innerseite eines Unterarmes entnommen, da die Haut physiologischerweise dort eine recht hohe Schweißdrüsendichte (Akkrine) aufweist. Liappis *et. al* (1980) haben die Beeinflussung der oraler hormoneller Kontrazeptiva auf den Aminosäureverluste durch die Schweiß studiert. Die Einnahme von Hormonen führt zu einer geringfügigen Annahme des Tauringehaltes im Plasma und im Urin. Im Schweiß dagegen sind die Aminosäureausscheidungen der Frauen mit Hormoneinnahme etwas höher. Sind die Taurinausscheidung im Schweiß im Vergleich zu denen im Urin relativ gering, so sind sie keineswegs zu verlässigen, machen sie doch etwa 13 % der Stickstoffverluste im Schweiß aus (Consolazio, 1963). Damit haben sie aber erhebliche Bedeutung für den Proteinbedarf des Menschen und für die Aufstellung von Stickstoff-Bilanzuntersuchungen,

zumal die im Schweiß ausgeschiedenen Stickstoffmengen nicht durch Retention durch die Nieren kompensiert werden.

Referenze	Methode	Taurinspiegel ($\mu\text{mol/l}$)			Anregung von Schweißproduktion
		Plasma	Urin ($\mu\text{mol}/24\text{h}$)	Schweiß	
Gitlitz (1974)	AAA	51 ± 12 (n = 22)	870 ± 470 (n = 22)	15 ± 9 (n = 22)	Saunabaden (93-95°C)
Liappis (1975)	AAA	-	-	$3,8 \pm 1,4$ (n = 7)	In heißem Wasser (40-41°C)
Liappis (1979)	AAA	$85,1 \pm 35,8$ (n = 25)	-	-	-
Décombaz (1979)	AAA	-	$496,8 \pm 70,56$ (n = 10)	-	-
Askanazi (1980)	AAA	72 ± 5 (n = 15)	-	-	-
Liappis (1980)	AAA	-	-	20 ± 13 (n = 20)	Saunabaden (60°C)
Kopple (1982)	AAA	76 ± 15 (n = 9)	631 ± 312 (n = 14)	-	-
Smeraldi (1987)	AAA	63 ± 14 (n = 32)	$380-1898$ (n = 32)	-	-
Filho (1997)	HPLC	49 ± 12 (n = 27)			
Suliman (1997)	HPLC	50 ± 10 (n = 10)	-	-	-
Mauri (1998)	HPLC	$47 \pm 13,43$ (n = 28)	-	-	-
Pouw (1998)	HPLC	55 ± 5 (n = 8)	-	-	-
Forslund (2000)	AAA	$64,4 \pm 13,3$ (n = 7)	74 ± 41 (n = 7)	-	-
Inoue (2003)	HPLC	$48,9 \pm 7,5$ (n = 12)	-	-	-

Tab. 5-14: Taurinkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) in verschiedenen biologischen Matrices.

AAA: Aminosäuren-Auto-Analysator

HPLC: Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

5.3 FREISETZUNGS- UND PENETRATIONSUNTERSUCHUNG DES TAURINS

Mehrschichtmembranmodell (MLMM)

Dieses *in vitro*-Modell wurde zur Untersuchung der Freisetzung des Taurins aus der Basiscreme DAC verwendet. In dieser vorliegenden Arbeit wurde Glycerol als Akzeptormedium verwendet, wegen der sehr hohen Hydrophilie des Taurins. Durch die polare Route kann Taurin durch den *Stratum corneum* diffundieren. Die Basiscreme DAC, wo die maximale Taurinmenge (1%) inkorporiert wurde, ist eine amphiphile Creme mit 50% wässrigem Teil, wovon 10% Propylenglycol (PG) ist. Taurin besitzt eine gute Löslichkeit in PG (7,44 g/l bei 25°C). Die Ergebnisse der Dissertationsarbeit bestätigt, dass in Propylenglycol auflösendes Taurin schnell im Akzeptor (Glycerol) diffundiert hat („Solvent drag“-Effekt). Die Penetration eines ionische Wirkstoffs durch die Haut, wie Taurin, wird von *Stratum corneum* beschränkt (Dick, 1992), und seine Penetration in die Haut ist durch die Aufnahme des PGs von *Stratum corneum* erreicht (Bendas, 1995; Moser, 2001; Schneider, 1996).

Diffusionszelle nach Franz

Trotz der ausgeprägten hydrophilen Eigenschaften wurde Taurin auch in lipophilen Kompartimenten, wie *Stratum corneum* und *Dermis*, detektiert. Da hohe Konzentrationen in den Epidermis-, oberen Dermiskompartimenten und im Akzeptor gefunden wurden, ist davon auszugehen, dass die topische bzw. systemische Belastung des Organismus durch topisch appliziertes Taurin sehr hoch ist.

Aus der Literatur ist seit Kurzem bekannt, dass Taurin in Hautzellen eine wichtige Rolle bei zellulären Stressantworten spielt. Durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und wie man der Literatur entnehmen kann, ist Taurin nicht gleichmäßig in den Hautschichten verteilt. Immunhistochemische Analysen von Hautschnitten aus Ratten, Hunden und dem Menschen zeigten, dass Taurin in hohen Mengen in der Epidermis und hier insbesondere im äußeren *Stratum spinosum* und *Stratum granulosum* vorkommt, während in der Dermis schwächere Färbungen in Endothelzellen des Kapillarsystems, in einigen Fibroblasten und in Zellen der Schweißdrüsen gefunden wurden. Die Hornzellen der Epidermis waren frei von Taurin (Lobo, 2001; Janeke, 2003).

Die Verteilung von Taurin in der Haut junger und erwachsener Mäuse wurde von Watanabe (1995) mittels Mikroradioautographie untersucht. Nach Injektion von radioaktiv markiertem 1,2-³H Taurin reichert sich die frei verfügbare Aminosulfosäure in adulter Haut in der Epidermis und in den Scheiden der Haarfollikel an. Dermales Gewebe zeigte lediglich schwache radioaktive Signale. In der Haut von neugeborenen Mäusen war die höchste Taurinkonzentration in der Hypodermis zu finden, während die Dermis nahezu kein und die Epidermis vergleichsweise wenig Taurin enthielten (Watanabe, 1995). Eine höhere Auflösung der mikroskopischen Aufnahmen von Ratten- und Hundepidermis ermöglichte (Lobo, 2001) mit der gleichen Technik die spezifischere Lokalisation des Taurins im *Stratum granulosum*.

Auch aus der zuvor beschriebenen ungleichmäßigen Verteilung von Taurin in den verschiedenen Hautschichten wird angenommen, dass die starke Akkumulation von Taurin in den differenzierten und langsam keratinisierten Zellen des *Stratum spinosum* und *granulosum* entsprechend seiner Funktion als organisches Osmolyt des Hydratationszustandes dient, da in diesen Schichten bereits Wasserreduktionen nachgewiesen wurden (Warner, 1988). Bei fortschreitender Keratinisierung und Wasserreduktion der Keratinozyten des *Stratum granulosum* zu den Hornzellen, scheinen diese ihr Taurin auszuschleusen. Extrazelluläres Taurin kann dann von den darunter liegenden Zellen wieder aufgenommen werden, wodurch sowohl ein Taurin- als auch Feuchtigkeitsverlust über Hornschicht vermieden wird.

Schade (2006) hat gezeigt, dass die Höhe des Taurinspiegels in der Haut konzentrationsabhängig die UVB-Empfindlichkeit beeinflusst und folglich ein Schutz vor UVB-bedingten Hautschäden umso besser und effektiver ist, je näher am physiologischen Normbereich der Taurinspiegel in der Haut ist.

5.4 VERTRÄGLICHKEIT

Prüfungen am bebrüteten Hühnerei stellen einen Grenzfall zwischen *in vitro*- und *in vivo*-Systemen dar (Lüpke, 1985). Die Ergebnisse und Risikoeinstufungen zeigen i. d. R. eine sehr gute Übertragbarkeit zu den *in vivo*-Befunden am Säugetier (Leighton, 1985; Lüpke, 1985; Lüpke, 1986; Lüpke, 1987; Spielmann, 1991).

Bei allen Taurinapplikationen muss allerdings ein potenziell gesundheitsschädlicher Effekt durch Taurinüberdosierung beachtet werden. Das „National Institute for Occupational Safety

and Health (NIOSH)“ in Washington, DC, USA gibt den LD₅₀-Wert (Letaldosis, die bei 50% der Individuen zum Tode führt) für Taurin bei verschiedenen Säugetieren wie Ratten, Maus, Hund und Kaninchen zwischen 1000 – 7000 mg/kg Körpergewicht je nach Applikationsweise (oral, intravenös, intraperitoneal oder subkutan) an. Damit scheint Taurin eine nur geringe akute Toxizität zu besetzen. Im Vergleich dazu liegt die LD₅₀-Dosis der Aminosäure Cystein, dem Taurinvorläufer (**Abbildung 2-2**), bei Ratte und Maus zwischen 600 – 2000 mg/kg Körpergewicht je nach Applikationsweise. Die akute Toxizität für Natriumchlorid liegt je nach Applikationsweise bei Ratte, Maus und Mensch zwischen 650 – 3000 mg/kg Körpergewicht. Die Toxizität von Taurin liegt demnach in teilweise sogar unterhalb den Bereichen von Natriumchlorid und körpereigenen Aminosäuren. Übermäßige Taurinaufnahmen sollten vermieden werden, da die toxikologischen Effekte einer Überexposition nicht umfassend untersucht und zum Teil widersprüchlich sind.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Der erste Teil der Arbeit bestand darin, zwei elektrophoretische Methoden zu entwickeln und nach international anerkannten Kriterien zu validieren, um so Taurin in verschiedenen biologischen Matrices bestimmen zu können. Die integrierte Pulsamperometrie erfordert nur eine einfache Vorbereitung der Proben um underivatisiertes Taurin in den komplexen Matrices effizient trennen zu können. Zur Bestimmung des Taurins durch die fluorimetrische CE-Methode wurde eine Derivatisierung mit Fluorescamin benötigt. Jedoch war die Trennung von Derivaten nicht erfolgreich. Durch Zusatz von Pufferadditive zum Laufpuffer konnte eine gute Selektivität des Taurins im Plasma (40 mM Brij[®]35), im Urin und im Hautextrakt (0,88 mM β -Cyclodextrin) erreicht werden. Die Anwendung der kommerziellen fluorimetrischen Kapillarelektrophorese führte zwar zu einer höheren Empfindlichkeit im Vergleich zur nicht kommerziellen elektrochemischen Methode. Jedoch durch den Detektionsmodus der Laser-induzierten Fluoreszenz (LIFD) liegt die Nachweisgrenze des im picomolaren Bereich, während diese durch den elektrochemischen Detektor nur im mikromolaren Bereich liegt. Die Methode wurden nach den Richtlinie der „Food and Drug Administration“ (Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation) vollständig validiert und zeichnet sich im Besonderen dadurch aus, dass sie einfach anzuwenden und mit geringen Kosten verbunden ist. Die gemessenen Taurinspiegel sind in den verschiedenen Matrices bei fluorimetrischen bzw. elektrochemischen Detektion vergleichbar. Da kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Taurinkonzentration zwischen beiden Detektoren beobachtet wurde, sind die beide Methode äquivalent.

Bei der Untersuchungen der Diffusion des Taurins hat sich gezeigt, dass sich Taurin sehr gut aus einer Standardcreme (Basiscreme DAC) in die Haut diffundiert und ist sich Taurin nicht gleichmäßig in den Hautschichten verteilt. Die Taurinmenge in jeder Hautschicht wurde quantifiziert. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten außerdem, dass sich Taurin vor (natives Taurin) und nach der Applikation der Basiscreme DAC (1% Taurin) in der Epidermis und in oberem Dermis akkumuliert hat. Desweiteren wurde bei der Diffusionszelle nach Franz keine Abhängigkeit zwischen der Taurinkonzentration in den verschiedenen Hautschichten und der Versuchszeit (1-5h) nachgewiesen. Andererseits erhöhte sich die Taurinkonzentration im Akzeptor mit der Versuchszeit. Die Freisetzung des Taurins aus der Basiscreme DAC wurde mit einem Mehrschichtmembranmodell untersucht. Taurin wurde relativ schnell aus der Formulierung freigesetzt, es konnten aber keinerlei Abhängigkeiten

zwischen der Zeiten (ab 60 min) und Taurinkonzentration in den Akzeptoren nachgewiesen werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Altria, K.D.; Rudd, D.R.

An overview of method validation and system suitability aspects in capillary electrophoresis
Chromatographia, 1995, 41:325-331.

Altria, K.D.

Method validation in capillary electrophoresis

In: High Performance Capillary Electrophoresis. Khaledi, M.G.

United Kingdom: *John Wiley & Sons*, 1998, 146:557-579.

Ament, M.E.; Geggel, H.S.; Heckenlively, J.R.; Martin, D.A.; Kopple, J.

Taurine supplementation in infants receiving long-term total parenteral nutrition

Journal of the American College Nutrition, 1986, 2:127-135.

Askanazi, J.; Carpentier, Y.A.; Michelsen, C.B.; Elwyn, D.H.; Furst, P.; Kantrowitz, L.R.;

Gump, F.E.; Kinney, J.M.

Muscle and Plasma amino acids following injury: Influence of intercurrent infection

Annals of Surgery, 1980, 192:78-85.

Banks, W.J.

Integumentary system

In: Applied veterinary histology

St. Louis: *Mosby-Year Book*, 3. Aufl., 1993, 298-311.

Barry, B.W.

Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery

European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2001, 14:101-114.

Basher, A.W.P.; Novotny, M.J.; Hanna, P.E.

Failure of oral taurine supplementation to influence skin-flap survival in rats

Plastic Reconstruction Surgery, 1995, 95:888-893.

Bendas, B.; Schmalfuß, U.; Neubert, R.H.H.

Influence of propylene glycol as cosolvent on mechanisms of drug transport from hydrogels

International Journal of Pharmaceutics, 1995, 116:19-30.

Behne, M.J.; Meyer, J.W.; Hanson, K.M.; Barry, N.P.; Murata, S.; Crumrine, D.; Clegg, R.W.; Gratton, E.; Holleran, W.M.; Elias, P.M.; Mauro, T.M.

NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis

Journal of Biological Chemistry, 2002, 277:47399-47406.

Birdsall, T.C.

Therapeutic applications of taurine

Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic, 1998, 3:128-136.

Blatny, P.; Kvasnicka, F.

Application of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis to the determination of inorganic ions in food and feed samples

Journal of Chromatography A, 1999, 834:419-431.

Böcker, J.

Spektroskopie

Würzburg: *Vogel Buchverlag*, 1997.

Bronaugh, R.L.; Maibagh, H.I.

In vitro percutaneous absorption: principles, fundamentals, and applications

CRC Press, 1996

Butler, P.A.G.; Mills, B.; Hauser, P.C.

Capillary electrophoresis detector using a light emitting diode and optical fibers

The Analyst, 1997, 122:949-953.

Cammann, K.

Instrumentelle analytische Chemie

Heidelberg-Berlin: *Spektrum Akademischer Verlag*, 2001.

Chen, X.C.; Pan, Z.L.; Liu, D.S.; Han, X.

Effect of taurine on human fetal neuron cells: proliferation and differentiation

Advances Experimental Medicine and Biology, 1998, 442:397-403.

Chesney, R.W.

Taurine: its biological role and clinical implications

Advances in Pediatrics, 1986, 32:1-42.

Collin, C.; Gautier, B.; Gaillard, O.; Hallegot, P.; Chabane, S.; Bastien, P.; Peyron, M.;

Bouleau, M.; Thibaut, S.; Pruche, F.; Duranton, A.; Bernard, B.A.

Protective effects of taurine on human hair follicle grown in vitro

International Journal of Cosmetic Science, 2006, 28:289-298.

Consolazio, C.F.; Nelson, R.A.; Matoush, L.O.; Harding, R.S.; Canham, J.E.

Nitrogen excretion in sweat and its relation to nitrogen balance requirements

Journal of Nutrition, 1963, 79:399-406.

Dasgupta, P.K.; Bellamy, H.S.; Liu, H.; Lopez, J.L.; Loree, E.L.; Morris, K.; Petersen, K.;

Mir K.A.

Light emitting diode based flow-through optical absorption detectors

Talanta, 1993, 40:53-74.

Debbasch, C.; Ebenhahn, C.

Eye irritation cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition

Food and Chemical Toxicology, 2005, 43:155-165.

Décombaz, J.; Reinhardt, P.; Anantharaman, K.; Glutz, G.; Poortmans, J.R.

Biochemical changes in a 100 km run: free amino acids, urea, and creatinine

European Journal of Applied Physiology and Occupational Physiology, 1979, 41:61-72.

Değim, Z.; Çelebi, N.; Sayan, H.; Babül, A.; Erdoğan, D.; Take, G.

An investigation on skin wound healing in mice with a taurine-chitosan gel formulation

Amino Acids, 2002, 22:187-198.

Deutscher Arzneimittel-Codex (DAC)

Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart, Govi-Verlag Pharmaceutischer Verlag GmbH
Eschborn, 2000

Devreker, F.; Bergh, M.V.; Biramane, J.; Winston, R.M.L.; Englert, Y.; Hardy, K.
Effects of taurine on human embryo development in vitro
Human Reproduction, 1999, 14:2350-2356.

Dick, I.P.; Scott, R.C.

Pig ear skin as an in vitro model for human skin permeability
Journal of Pharmacy Pharmacology, 1992, 44:640-645.

Dominy, J.; Eller, S.; Dawson, R.J.

Building biosynthetic schools: reviewing compartmentation of CNS taurine synthesis
Neurochemical Research, 2004, 29:97-103.

Dumoulin, J.C.; Wissen, L.C.V.; Menheere, P.P.; Michiels, A.H.; Geraedts, J.P.; Evers, J.L.
Taurine acts as an osmolyte in human mouse oocytes and embryos
Biology Reproduction, 1997, 56:739-744.

Eckert, R.L.

The structure and function of skin

In: Pharmacology of the skin. Mukhtar, H., *CRC Press*, Boca Raton, Ann Arbor, 1992, 3-12.

Elias, P.M.

Epidermal lipids, barrier function and desquamation

The Journal of Investigative Dermatology, 1983, 80:44-49.

Engelhardt, H.; Beck, W.; Schmitt, T.

Kapillarelektrophorese: Methoden und Möglichkeiten

Wiesbaden: *Vieweg Verlag*, 1994.

Falco, O.B.; Langner, A.; Christophers, E.

Über den Einbau von ³⁵S-markiertem Sulfat in die Haut bei Psoriasis (in vitro)

Archiv für klinische u. experimentelle Dermatologie, 1966, 224:310-317.

FDA – US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.
Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001

(<http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/4252fnl.htm>)

Filho, J.C.D.; Bárány, P.; Stehle, P.; Fürst, P.; Bergström, J.

Free amino-acid levels simultaneously collected in plasma, muscle, and erythrocytes of uraemic patients

Nephrology Dialysis Transplantation, 1997, 12:2339-2348.

Fluhr, J.W.; Kao, J.; Jain, M.; Ahn, S.K.; Feingold, K.R.; Elias, P.M.

Generation of free fatty acids from phospholipids regulates stratum corneum acidification and integrity

Journal of Investigative Dermatology, 2001, 117:44-51.

Forslund, A.H.; Hambræus, L.; Beurden, H.; Holmbäck, U.; El-Khoury, A.E.; Hjorth, G.; Olsson, R.; Stridsberg, M.; Wide, L.; Åkerfeldt, T.; Regan, M.; Young, V.R.

Inverse relationship between protein intake and plasma free amino acids in healthy men at physical exercise

American Journal of Physiology, 2000, 278:857-867.

Foschi, D.; Trabucchi, E.; Musazzi, M.; Castaldi, L.; Di Mattia, D.; Radaelli, E.; Marazzi, M.; Franzini, P.; Berlusconi, A.

The effects of oxygen free radicals on wound healing

International Journal of Tissue Reactions, 1988, 10:373-379.

Fox, P.R.; Trautwein, E.A.; Hayes, K.C.; Bond, B.R.; Sisson, D.D.; Moise, N.S.

Comparison of taurine, alpha-tocopherol, retinol, selenium, and total triglycerides and cholesterol concentrations in cats with cardiac disease and in healthy cats

American Journal of Veterinary Research, 1993, 54:563-569.

Franz, T.J.

Percutaneous absorption: on the relevance of in vitro data

The Journal of Investigative Dermatology, 1975, 64:190-195.

Frison, J.C.; Ras, M.R.; Masdeu, S.; Rubies-Prat, J.

Bile acids. I. Nature, physiology, and functions

Medicine Clinica, 1979, 72:306-310.

Fritsch, P.

Aufbau und Funktionen der Haut

In: *Dermatologie und Venerologie, Lehrbuch und Atlas*

Berlin: *Springer-Verlag*, 1998, 3-31.

Gassmann, E.; Kuo, J.E.; Zare, R.N.

Electrokinetic separation of chiral compounds

Science, 1985, 230:813-814.

Gebauer, P.; Boček, P.

Recent progress in capillary isotachopheresis

Electrophoresis, 2000, 21:3898-3904.

Gebauer, P.; Boček, P.

Recent progress in capillary isotachopheresis

Electrophoresis, 2002, 23:3858-3864.

Gitlitz, P.H.; Sunderman, F.W.; Hohnadel, D.C.

Ion-exchange chromatography of amino acids in sweat collected from healthy subjects during sauna bathing

Clinical Chemistry, 1974, 20:1305-1312.

Gloor, M.

Pharmakologie dermatologischer Externa

Heidelberg: *Sprinter-Verlag*, 1982.

Gordon, R.E.; Shaker, A.A.; Solano, D.F.

Taurine protects hamster bronchioles from acute NO₂-induced alterations. A histologic, ultrastructural, and freeze-fracture study

American Journal of pathology, 1986, 125:585-600.

Graham, D.E.; Xu, H.; White, R.H.

Identification of coenzyme M biosynthetic phosphosulfolactate synthase: a new family of sulfonated biosynthesizing enzymes

Journal of Biological Chemistry, 2002, 277:13421-13429.

Habermehl, K.H.

Haut und Hautorgane

In: Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere. Kreislaussystem, Haut und Hautorgane.

Nickel, R.; Schummer, A.; Seiferle, E. Bd. 3, 2. Aufl., Berlin: Parey, 1984, 453-584.

Hachem, J.P.; Crumrine, D.; Fluhr, J.; Brown, B.E.; Feingold, K.R.; Elias, P.M.

pH directly regulates epidermal permeability barrier homeostasis, and stratum corneum integrity/cohesion

Journal of Investigative Dermatology, 2003, 121:345-353.

Harrison, S.M.; Barry, B.W.; Dugard, P.H.

Effects of freezing on human skin permeability

Journal of Pharmacy Pharmacology, 1984, 36:261-262.

Hauser, P.C.; Rupasinghe, T.W.T.; Cates, N.E.

A multi wavelength photometer based on light-emitting diodes

Talanta, 42:605-612, 1995.

Hauser, P.C.; Rupasinghe, T.W.T.

Simultaneous determination of metal ion concentrations in binary mixtures with a multi-LED photometer

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 1997, 357:1056-1060.

Hayes, K.C.; Carey, R.E.; Schmidt, S.Y.

Retinal degeneration associated with taurine deficiency in the cat

Science, 1975, 188:949-951.

Hayes, K.C.; Trautwein, E.A.

Taurine deficiency syndrome in cats

The Veterinary Clinics of North America, 1989, 19:403-413.

Hjerten, S.

Free zone electrophoresis

Chromatographic Reviews, 1967, 2:122-219.

Högstrom, H.

Mechanisms and prevention of decrease in wound margin strength in intestinal anastomoses and laparotomy wounds

Acta Chirurgica Scandinavica Supplementum, 1987, 539:1-63.

Howes, D.; Guy, R.; Hadgraft, J.

Methods for assessing percutaneous absorption

Alternatives to Laboratory Animals, 1996, 24:81-106.

Huxtable, R.J.; Bressler, R.

Effect of taurine on a muscle intracellular membrane

Biochemica et Biophysica Acta, 1973, 323:573-583.

Huxtable, R.J.

Taurine in the central nervous system and the mammalian actions of taurine

Progress in Neurobiology, 1989, 32:471-533.

Huxtable, R.J.

Physiological actions of taurine

Physiological Reviews, 1992, 72:101-163.

Inoue, H.; Fukunaga, K.; Tsuruta, Y.

Determination of taurine in plasma by high-performance liquid chromatography using 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride as a fluorescent labelling reagent

Analytical Biochemistry, 2003, 319:138-142.

Jacobsen, J.G.; Smith, L.M.

Biochemistry and physiology of taurine and taurine derivatives

Physiological Reviews, 1968, 48:424-511.

Jahn, K.; Fischer, A.; Neubert, R.H.H.; Wohlrab, J.

Investigation of the penetration behaviour of mycophenolate mofetil from a semisolid formulation into human skin ex vivo

Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2001, 53:1581-1587.

Janeke, G.; Siefken, W.; Carstensen, S.; Springmann, G.; Bleck, O.; Steinhart, H.; Höger, P.; Wittern, K.P.; Wenck, H.; Stäb, F.; Sauermann, G.; Schreiner, V.; Doering, T.

Role of taurine accumulation in keratinocyte hydration

Journal of Investigative Dermatology, 2003, 121:354-361.

Jorgenson, J.W.; Lukacs, K.D.

Zone electrophoresis in open-tubular glass-capillaries

Analytical Chemistry, 1981a, 1298-1302.

Jorgenson, J.W.; DeArman Lukacs, K.

High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis

Journal of Chromatography A, 1981b, 209-216.

King, M.; Paull, B.; Haddad, P.R.; Macka, M.

Performance of a simple UV LED light source in the capillary electrophoresis of inorganic anions with indirect detection using a chromate background electrolyte

The Analyst, 2002, 127:1564-1567.

Klein, D.C.; Wheler, G.H.T.; Weller, J.L.

Taurine in pineal gland

Progress Clinical Research, 1983, 125:169-181.

Kloss, G.

Freie Aminosäuren und andere Ninhydrin-positive Substanzen in normaler Hornschicht und Psoriasis-Schuppen

Archives of Dermatological Research, 1967, 228:188-198.

Kopple, J.D.; Blumenkrantz, M.J.; Jones, M.R.; Moran, J.K.; Coburn, J.W.

Plasma amino acid levels and amino acid losses during continuous ambulatory peritoneal dialysis

The American Journal of Clinical Nutrition, 1982, 36:395-402.

Krivacsy, Z.; Gelencser, A.; Hlavay, J.; Kiss, G.; Sarvari, Z.

Electrokinetic injection in capillary electrophoresis and its application to the analysis of inorganic compounds

Journal of Chromatography A, 1999, 834:21-44.

Kromidas, S.

Validierung in der Analytik

Weinheim: *Wiley-VCH*, 1999.

Lademann, J.; Otberg, N.; Richter, H.; Jacobi, U.; Schaefer, H.; Peytavi, U.B.; Sterry, W.

Follikuläre Penetration – ein entscheidender Penetrationsweg von topisch applizierten Substanzen

Hautarzt, 2003, 54:321-323.

Lallemand, F.; Witte, P.

Taurine concentration in the brain and in the plasma following intraperitoneal injections

Amino Acids, 2004, 26:111-116.

Lawrence, R.S.; Ackroyd, D.M.

The chorioallantoic membrane in the prediction of eye irritation potential

Toxicology in Vitro, 1990, 4:321-323.

Leighton, J.; Nassauer, J.

The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye

Food and Chemical Toxicology, 1985, 25:292-298.

Leonhardt, H.

Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen

Stuttgart: *Thieme Verlag*, 8. Aufl., 1990, 342-358.

Liappis, N.; Jäkel, A.

Über die Ausscheidung der freien Aminosäuren im menschlichen ekkrinen Schweiß

Archives of Dermatological Research, 1975, 254:185-203.

Liappis, N.; Beeser, H.; Bantzer, P.

Veränderung der Aminosäure-Konzentration im Plasma von ACD-Blutkonserven während der Lagerung

Blut, 1979, 38:311-319.

Liappis, N.; Kochbeck, E.; Eckhardt, G.; Hahne, H.; Kessler, K.; Bantzer, P.

Aminosäurenverluste im menschlichen Schweiß

Archives of Dermatological Research, 1980, 269:311-323.

Liappis, N.; Janssen, E.; Kessler, K.; Hildenbrand, G.

A quantitative study of free amino acids in eccrine sweat collected from the forearms of healthy young men during sauna bathing

European Journal of Applied Physiology, 1980, 45:63-67.

Liebich, H.G.; Reese, S.; Budras, K.H.

Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis

Stuttgart: *Schattauer*, 3. Aufl., 1999, 303-324.

Lombardini, J.; Schaffer, S.

Taurine – Nutritional value and mechanisms of action

Advances in Experimental Medicine and Biology 315; Plenum Press: New York, 1992.

Lobo, M.V.; Alonso, F.J.; Latorre, A.; Martín del Río, R.

Taurine levels and localisation in the stratified squamous epithelia

Histochemistry and Cell Biology, 2001, 115:341-347.

Lu, Q.; Collins, G.E.

Microchip separations of transition metal ions via LED absorbance detection of their PAR complexes

Analyst, 2001, 126:429-432.

Ludwig, H.

Mathematische Grundlagen für Pharmazeuten

Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft*, 1987

Lüpke, N.P.

Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential

Food Chemical Toxicology, 1985, 23:287-291.

Lüpke, N.P.; Kemper, F.H.

The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test

Food and Chemical Toxicology, 1986, 24:495-496.

Lüpke, N.P.

The chicken egg test (CET). A pharmacological - toxicological experimental model

Aertliche Kosmetologie, 1987, 13-30.

Lüpke, N.P.

Toxikologisch-pharmakologische Prüfmöglichkeiten am bebrüteten Hühnerei

In: Schöffl, H.; Hermann, R.S.-; Tritthart, H.A. *Möglichkeiten und Grenzen der Reduktion von Tierversuchen.*, Berlin: *Springer*, 1992, 37-49.

Lüiring, C.; Kalteis, T.; Wild, K.; Perlick, L.; Grifka, J.
Gewebetoxizität lokaler Anästhetika im HET-CAM-Test
Der Schmerz, 2003, 17:185-190.

Macka, M.; Andersson, P.; Haddad, P.R.
Linearity evaluation in absorbance detection: the use of light emitting diodes for on capillary
detection in capillary electrophoresis
Electrophoresis, 1996, 17:1898-1905.

Martensson, J.; Larsson, J.; Nordstrom, H.
Amino acid metabolism during the anabolic phase of severely burned patients: with special
reference to sulphur amino acids
European Journal Clinical Investigation, 1987, 17:130-135.

Matousek, J.L.; Campbell, K.L.
A comparative review of cutaneous pH
Veterinary Dermatology, 2002, 13:293-300.

Mauri, M.C.; Ferrara, A.; Boscati, L.; Bravin, S.; Zamberlan, F.; Alecci, M.; Invernizzi, G.
Plasma and Platelet amino acid concentrations in patients affected by major depression and
under fluvoxamine treatment
Neuropsychobiology, 1998, 37:124-129.

McMahon, G.P.; O'Kennedy, R.; Kelly, M.T.
High-performance liquid chromatographic determination of taurine in human plasma using
pre-column extraction and derivatization
Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis, 1996, 14:1287-1294.

Mikkers, F.E.P.; Eceraerts, F.M.; Verheggen, T.P.E.M.
High-performance zone electrophoresis
Journal of Chromatography A, 1979, 11-20.

Molina, M.; Silva, M.

Micellar electrokinetic chromatography: current developments and future

Electrophoresis, 2002, 23:3907-3921.

Montagna, W.

Comparative anatomy and physiology of the skin

Archives Dermatology, 1967, 96:357-363.

Moser, K.; Kriwet, K.; Naik, A.; Kalia, Y.N.; Guy, R.H.

Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro

European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001, 52:103-112.

Neubert, R.; Wohlrab, W.

In vitro methods for the biopharmaceutical evaluation topical formulations

Acta Pharmaceutica Technologica, 1990, 36:197-206.

Neubert, R.; Bendas, C.; Wohlrab, W.; Gienau, B.; Fürst, W.

A multilayer membrane system for modelling drug penetration into skin

International Journal of Pharmaceutics, 1991, 75:89-94.

Neubert, R.; Winter, K.; Bendas, B.

Bestimmung der Arzneistoffverfügbarkeit aus kommerziellen topischen Zubereitungen mit dem Mehrschichtmembranmodell

Pharmazie, 1993, 48:54-56.

Neubert, R.; Wohlrab, W.; Marsch, W.

Dermatopharmazie: Vehikel – Wirkstoffe – Pharmakologie

Stuttgart: *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH*, 2001.

Neubert, R.H.H.; Rüttinger, H.H.

Affinity capillary electrophoresis in pharmaceutics and biopharmaceutics

Basel: *Marcel Dekker*, 2003.

Nobel Lectures Chemistry

Amsterdam: *Elsevier*, 1964, 1942-1962.

O'Flaherty, L.; Stapleton, P.P.; Redmond, H.P.; Bouchier-Hayes, D.

Dexamethasone and lipopolysaccharide regulation of taurine transport in Caco-2 cells

Journal of Surgical Research, 1997, 69:331-336.

Öhman, H.; Vahlquist, A.

The pH gradient over the stratum corneum differs in X-linked recessive and autosomal dominant ichthyosis: a clue to the molecular origin of the "acid skin mantle"?

Journal of Investigative Dermatology, 1998, 111:674-677.

Ohlenschläger, G.; Berger, I.; Depner, W.

Synopsis der Elektrophorese Techniken

Darmstadt: *GIT-Verlag*, 1980.

Panchenko, E.L.; Chesney, R.W.; Roy III, S.; Budreau, A.M.; Boehm, K.A.

The differential diagnostic value of urinary enzyme and amino acid in children with nephrotic syndrome

Pediatric Nephrology, 1994, 8:142-147.

Pasantes-Morales, H.; Cruz, C.

Protective effect of taurine and zinc on peroxidation-induced damage in photoreceptor outer segments

Journal of Neuroscience Research, 1984, 11: 303-311.

Pflucker, F.; Pfeiffer, S.; Duesing, H.J.; Barlag, H.G.; Diembeck, W.

Excised porcine skin – morphological changes resulting from storage conditions and its dermal absorption and penetration properties in vitro

In: Perspectives in percutaneous penetration, Brain, K.R.; James, V.J.; Walters, K.A., vol.5a, 1997.

Pion, P.D.; Kittleson, M.D.; Roders, Q.R.; Morris, J.G.

Myocardial failure in cats associated with low plasma taurine: a reversible cardiomyopathy
Science, 1987, 237:764-768.

Pitkänen, H.T.; Oja, S.S.; Kemppainen, K.; Seppä, J.M.; Mero, A.A.

Serum amino acid concentrations in aging men and women
Amino Acids, 2003, 24:413-421.

Pouw, E.M.; Schols, A.M.W.; Deutz, N.E.P.; Wouters, E.F.M.

Plasma and muscle amino acid levels in relation to resting energy expenditure and inflammation in stable chronic obstructive pulmonary disease
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 1998, 158:797-801.

Pyell, U.

Micellar electrokinetic chromatography – from theoretical concepts to real samples (Review)
Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 2001, 371:691-703.

Redmond, H.P.; Stapleton, P.P.; Neary, P.; Bouchier-Hayes, D.

Immunonutrition: the role of taurine
Nutrition, 1998, 14:599-604.

Richter, W.; Linss, W.

Haut und Hautanhangsgebilde

In: Linss, W.; Fasshänel, J. Histologie, Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie., Berlin: *Walter de Gruyter*, 307-321, 1998.

Rippke, F.; Schreiner, V.; Schwanitz, H.J.

The acidic milieu of the horny layer: new findings on the physiology and pathophysiology of skin pH
American Journal Clinical Dermatology, 2002, 3:261-272.

Riviere, J.E.; Bowman, K.F.; Riviere, N.A.M.

The isolated perfused porcine flap: A novel model for cutaneous toxicological research
In: Tumbleson, M.E. Swine in biomedical research, New York: *Plenum*, 1986, 657-666.

Roe, D.A.

Taurine intolerance in psoriasis

The Journal of Investigative Dermatology, 1966, 46:420-430.

Satoh, H.

Cardiac actions of taurine as a modulator of the ion channels

Advances in Experimental Medicine and Biology, 1998, 442:121-128.

Schade, N.

Ein hoher Taurinlevel in der Haut ist natürlicher zellulärer Schutzmechanismus gegen
Ultraviolett B-induziert immunsuppression in Mäusen

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, 2006.

Schaefer, H.; Hensby, C.N.

Skin permeability and models of percutaneous absorption

In: Galli, C.; Hensby, C.N.; Marinovich, M. Skin pharmacology and toxicology. *Nato ASI Series, Series A. Life Science*, 1990, 181:77-83.

Schendel, K.U.; Erdinger, L.; Komposch, G.; Sonntag, H.-G.

Untersuchung kieferorthopädischer Materialien im HET-CAM-Test auf schleimhautreizende
Wirkung

Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie, 1994, 55:28-35.

Schneider, I.M.; Dobner, B.; Neubert, R.; Wohlrab, W.

Evaluation of drug penetration into human skin ex vivo using branched fatty acids and
propylene glycol

International Journal of Pharmaceutics, 1996, 145:187-196.

Smeraldi, E.; Luccas, A.; Macciardi, F.; Bellodi, L.

Increased concentrations of various amino acids in schizophrenic patients

Human Genetics, 1987, 76:138-140.

Smole, J.

Grundlagen der Dermatologie

In: Henz, B.M.; Kerl, H.; Rosenbach, T.; Sterry, W. Dermatologie und Venerologie. 2.Aufl., Berlin: *Walter de Gruyter*, 1998.

Spaeth, D.G.; Schneider, D.L.; Sarett, H.P.

Taurine synthesis, concentration, and bile salt conjugation in rat, guinea pig, and rabbit
Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1974, 147:855-858.

Spielmann, H.; Gerner, I.

Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany
Toxicology in Vitro, 1991, 5:539-542.

Steiling, W.; Bracher, M.

The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients
Toxicology in Vitro, 1999, 13:375-384.

Stein, W.H.; Moore, S.

The free amino acids of human blood plasma
The Journal of Biological Chemistry, 1954, 211:915-926.

Strege, M.; Lagu, A.

Separation of DNA restriction fragments by capillary electrophoresis using coated fused silica capillaries
Analytical Chemistry, 1991, 63:1233-1236.

Sturman, J.A.; Gaull, G.E.

Taurine in the brain and liver of the developing human and monkey
Journal of Neurochemistry, 1975, 25:831-835.

Sturman, J.A.; Hayes, K.C.

The biology of taurine in nutrition and development
Advances Nutritional Research, 1980, 3:231-299.

Suliman, M.E.; Anderstam, B.; Lindholm, B.; Bergström, J.
Total, free, and protein-bound sulphur amino acids in uraemin patients
Nephrology Dialysis Transplantation, 1997, 12:2332-2338.

Terabe, S.; Otsuka, K.; Ichikawa, K.; Tsuchiya, A.; Ando, T.
Electrokinetic separations with micellar solutions and open tubular capillaries
Analytical Chemistry, 1984, 56:111-113.

Tiedemann, F.; Gmelin, L.
Einige neue Bestandteile der Galle des oxsen
Annalen der Physik, 1827, 85:326-337.

Timbrell, J.A.; Seabra, V.; Waterfield, C.J.
The in vivo and in vitro protective properties of taurine
General Pharmacology: The Vascular System, 1995, 26:453-462.

Tiselius, A.
A new apparatus for electrophoretic analysis of colloidal mixtures
Transactions of the Faraday Society, 1937, 33:524-531.

US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (FDA)
Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation.
www.fda.gov/cder/guidance/4252fnl.htm 2001

Vessey, D.A.; Crissey, M.H.; Zakim, D.
Kinetic studies on the enzymes conjugating bile acids with taurine and Glycine in bovine liver
Biochemical Journal, 1977, 163:181-183.

Wagner, H.; Kostka, K.H.; Lehr, C.M.; Schaefer, U.F.
Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data
Pharmaceutical Research, 2000, 17:1475-1481.

Wahren, J.; Felig, P.; Cerasi, E.; Luft, R.

Splanchnic and peripheral glucose and amino acid metabolism in diabetes mellitus

The Journal of Clinical Investigation, 1972, 51:1870-1878.

Warner, R.R.; Myes, M.C.; Taylor, D.A.

Electron probe analysis of human skin: determination of the water concentration profile

Journal of Investigative Dermatology, 1988, 90:218-224.

Warskulat, U.; Reinen, A.; Grether-Beck, S.; Krutmann, J.; Haussinger, D.

The osmolyte strategy of normal human keratinocytes in maintaining cell homeostasis

Journal of Investigative Dermatology, 2004, 123:516-521.

Watanabe, H.; Watanabe, M.; Jo, N.; Kiyokane, K.; Shimada, M.

Distribution of [1,2-³H]Taurine in the skin of adult and newborn mice studied by microradioautography

Cellular and Molecular Biology, 1995, 41:49-55.

Wätzig, H.; Degenhardt, M.; Kunkel, A.

Strategies for method development and validation in CE – related to pharmaceutical and biological applications

Electrophoresis, 1998, 19:2695-2752.

White, M.J.; Heckler, F.R.

Oxygen free radicals and wound healing

Clinics in Plastic Surgery, 1990, 17:473-484.

Wolffram, S.

Die Aminosäure Taurin – Physiologie und Pathophysiologie

Schweizer Archiv für Tierheilkunde, 1991, 133:467-476.

Worden, J.A.; Stipanuk, M.H.

A comparison by species, age and sex of cysteinesulfinate decarboxylase activity and taurine concentration in liver and brain of animals

Comparative Biochemistry and Physiology B, 1985, 82:233-239.

Wright, C.E.; Tallan, H.H.; Lin, Y.Y.; Gaull, G.E.

Taurine: biological update

Annual Review Biochemistry, 1986, 55:427-453.

Xu, J.; Wang, Y.; Xian, Y.; Jin, L.; Tanaka, K.

Preparation of multiwall carbon nanotubes film modified and its application to simultaneous determination of oxidizable amino acids in ion chromatography

Talanta, 2003, 29:1123-1130.

Ye, J.; Baldwin, R.

Determination of amino acids and peptides by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode

Analytical Chemistry, 1994, 66:2669-2674.

Yokoyama, T.

High-performance liquid chromatographic determination of taurine in biological fluids by post-column fluorescence reaction with thiamine

Journal of Chromatography, 1991, 568:212-218.

Zackheim, H.S.

Taurine and diet in psoriasis

Archives of Dermatology, 1982, 118, 961.

Zelikovic, I.; Stejskal-Lorenz, E.; Lohstroh, P.; Budreau, A.; Chesney, R.W.

Anion dependence of taurine transport by rat renal brush-border membrane vesicles

American Journal of Physiology – Renal Physiology, 1989, 256:646-655.

8 ANHANG

STATISTISCHE DATENANALYSE

Die statistische Datenanalyse erfolgte mit Hilfe der Software Excel[®] 2007 (Microsoft[®]) und Origin für Windows.

Deskriptive Statistik

Zur zusammenfassenden Darstellung der Daten wurden verschiedene Lage- und Streumaße herangezogen. Dies waren:

Median (\tilde{x}):

Der Wert, über und unter dem jeweils die Hälfte aller Fälle liegt; das 50. Perzentil. Bei einer geraden Anzahl von Fällen ist der Median der Mittelwert der zwei mittleren Fälle, wenn diese auf- oder absteigend sortiert sind

Arithmetischer Mittelwert (\bar{x}):

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Standardabweichung (SD):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

\bar{x} = Mittelwert aus n Einzelmessungen

x_i = Messwert

n = Anzahl der Messungen

Relative Standardabweichung (RSD):

$$VK = \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}}{\bar{x}} \cdot 100[\%]$$

Spannweite (Range):

Die Spannweite wird durch den größten (Maximum) und kleinsten Wert (Minimum) der Verteilung terminiert.

Statistischer Test zur Prüfung von Unterschiedshypothesen

Mit Hilfe der klassischen Teststatistik wird ermittelt, welche von zwei gegensätzlichen Hypothesen – Nullhypothese oder Alternativhypothese – angenommen werden kann. Die Nullhypothese ist eine Negativhypothese, mit der behauptet wird, dass die zur Alternativhypothese (H_A) komplementäre Aussage richtig ist. Die Entscheidung, ob die Alternativhypothese, die die zu beweisende Theorie beinhaltet, akzeptiert werden kann oder nicht, wird von der Nullhypothese aus getroffen. Ziel der Teststatistik ist es, die Wahrscheinlichkeit (p) zu berechnen, mit der die Nullhypothese fälschlicherweise abgelehnt wird (Irrtumswahrscheinlichkeit). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Nullhypothese verworfen, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner oder gleich 5 % betrug ($p < 0,05$), das Signifikanzniveau lag somit bei 5 %. Ein Hochsignifikantes Ergebnis lag bei $p < 0,01$, ein höchstsignifikantes bei $p < 0,001$ vor. Nachfolgend werden die verwendeten Tests kurz erläutert.

Die statistischen Auswertungen der Versuche wurden mit Hilfe der Software „STATISTICA“ Version 1999 durchgeführt. Die normalverteilten Wertegruppen wurden einer Signifikanzbetrachtung mittels t -Test für gepaarte Stichproben unterzogen. Signifikante Unterschiede wurden unter der Bedingung $p < 0,05$ erkannt.

Korrelationsanalyse

Die Korrelationsanalyse eignet sich, um die Stärke und die Richtung eines Zusammenhangs zwischen zwei Variablen zu untersuchen. Die Berechnung basiert auf Wertepaaren, die aus den zur Verfügung stehenden Daten gebildet werden. Der Korrelationskoeffizient r gibt die Stärke des Zusammenhangs an. Er kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Ein perfekter Zusammenhang liegt bei $r = 1$ vor; fehlt jeglicher Zusammenhang ist $r = 0$. Ein negativer Korrelationskoeffizient signalisiert einen gegenläufigen Zusammenhang (**Tabelle 6-2**). Es ist üblich, das Ausmaß der Korrelation in Abhängigkeit von r zu benennen (Ludwig, 1987):

Tab. 6-2: Korrelationskoeffizient und Ausmaß des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen.

Korrelationskoeffizient	Ausmaß der Korrelation
$r \geq 0,9$	sehr hoch
$r < 0,9$	hoch
$r < 0,7$	mittel
$r < 0,5$	gering
$r < 0,2$	sehr gering

Die Berechnung des Korrelationskoeffizienten richtet sich nach dem Skalenniveau und der Verteilung der Variablen. Bei intervallskalierten, normalverteilten Variablen wurde der Korrelationskoeffizient nach Pearson, bei mindestens einer ordinalskalierten oder nicht-normalverteilten Variablen wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Kendall berechnet.

EXTRAKTION DES TAURINS AUS DER HUMANHAUT

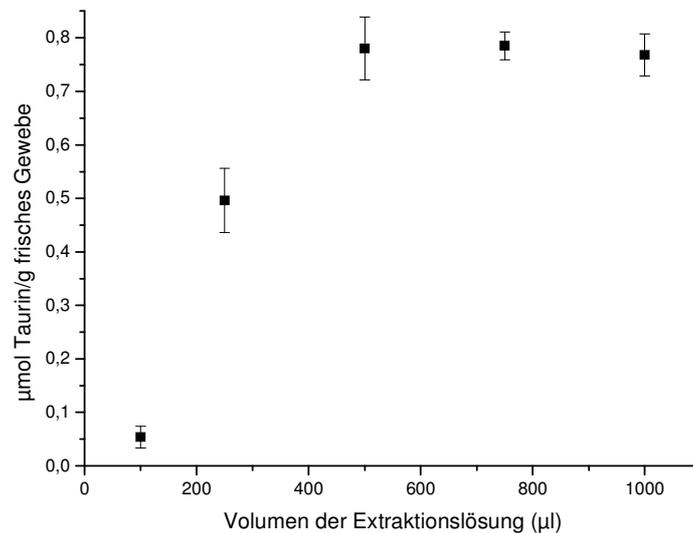


Abb. 8-1: Extraktion des Taurins aus der Humanhaut (30 min, 35 mg Hautstück).

9 LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Dayse Luzia Pinheiro da Silva
Fuhneweg 3
06122 Halle

Geb. am 14.11.1976 in Apodi-RN (Brasilien)
Staatsangehörigkeit: Brasilien

Schulbildung

1982-1992

Grundschule in Apodi, Brasilien

1993-1996

Gymnasium in Natal, Brasilien

Studium

1997-01/2001

Pharmaziestudium an der Bundesuniversität
von Rio Grande do Norte (UFRN), Natal, Brasilien

08-11/2000

Diplomarbeit (klinische Pharmazie)
„Aufklärung der Anämie“

03/2001-06/2003

Dissertation zur Erlangung des MSc-Grades in Chemie
(Physik-Chemie von Polymere) Thema „Rheological study
on O-acetylated chitosan gels“ unter Leitung von
Prof. Dr. Garcia an der UFRN, Natal, Brasilien

Studienbegleitende

Praktika

1997-1998

Wissenschaftliche Hilfskraft im Projekt „Biopolymer
Applications of New Pharmaceutical Forms“ unter Leitung von
Prof. Dr. Raffin an der UFRN, Natal, Brasilien

1998-2000

Stipendiat von CNPq/CAPES im Projekt „Biopolymer
Applications of New Pharmaceutical Forms“ unter Leitung von
Prof. Dr. Raffin an der UFRN, Natal, Brasilien

Studium Deutschland

01-02/2003

DAAD-Stipendiat Hochschulwinterkurs an der Universität
Freiburg

12/2003-03/2004

DAAD-Stipendiat Deutschintensivkurs, InterDaf e.V. am
Herder-Institut der Universität Leipzig

Seit 04/2004

Doktorandin (DAAD-Stipendiatin bis 09/2007) am Institut für
Pharmazie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. R.H.H. Neubert

12/2008

Verteidigung der Doktorarbeit

Thema: Entwicklung von analytischen Methoden zur Bestimmung
des Taurins in biologischen Matrices und Untersuchungen der
Diffusion des Taurins durch die exzidierte Humanhaut

Publikationen:

Fachzeitschriften mit Gutachtersystem:

1. Silva, D.L.P.; Mrestani, Y.; Rüttinger, H.H.; Wohlrab, J.; Neubert, R.H.H. Comparison between fluorescence and pulsed integrated electrochemical detectors for the determination of taurine in human skin, urine and plasma by CE, *Chromatographie*, 2008, 67:813-817.
2. Silva, D.L.P.; Thiago, S.B.; Pessôa, F.A.; Mrestani, Y.; Rüttinger, H.H.; Wohlrab, J.; Neubert, R.H.H. Penetration profile of taurine in the human skin and its distribution in skin layers, *Pharmaceutical Research*, 2008, 25:1846-1850.
3. Silva, D.L.P.; Garcia, R.B.; Costa, M. Avaliação de géis obtidos a partir da acetilação da quitosana em meio heterogêneo, *Química Nova*, 2008, 31:486-492.
4. Silva, D.L.P.; Rüttinger, H.H.; Mrestani, Y.; Baum, W.F.; Neubert, R.H.H. Development of capillary electrophoresis methods for quantitative determination of taurine in vehicle system and biological media, *Electrophoresis*, 2006, 27:2330-2337.

Tagungsbeiträge:

1. Silva, D.L.P.; Rüttinger, H.H.; Mrestani, Y.; Baum, W.F.; Neubert, R.H.H. Use of capillary electrophoresis to determine taurine in vehicle system and biological sample. In: 5th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, 2006, Geneva. Abstract: *APV Arbeitsgemeinschaft für pharmazeutische Verfahrenstechnik* (Poster)
2. Silva, D.L.P.; Raffin, F.N.; Garcia, R.B. Estudo reológico de géis de quitosana Oacetilada. In: XV Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 2002, 1:31-36. (Poster)
3. Silva, D.L.P.; Canela, K.M.N.; Moura, T.F.L.; Raffin, F.N.; Egito, E.S.T.; Garcia, R.B. Chitosan application on compressed solid dosage form. In: CIFAR 2001 3rd Congress of Pharmaceutical Sciences, 2001, Águas de Lindóia-SP, Brasilien. Abstract: *European Journal of Pharmaceutical Technology*, 2001, 143:143-144. (Poster)
4. Silva, D.L.P.; Moura, T.F.L.; Raffin, F.N.; Egito, E.S.T.; Garcia, R.B. Study of chitosan as excipient for controlled release. In: IV PHARMATECH, 1999, Natal-RN, Brasilien. Abstract: *New Perspective in Drug Delivery Systems*, 1999, 1:78. (Poster)

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Anwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen übernommenen Gedanken sind als solche kennlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Dayse Luzia P. da Silva

Dayse Luzia Pinheiro da Silva

Halle (Saale), 20.08.2008