



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung zur Gewebsaufnahme und
Gewebsbindung ausgewählter Anthrachinone“

verfasst von

Valerie Klug

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2014

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie UniStG

Betreut von:

Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka

Danksagung

In erster Linie bedanke ich mich herzlich bei Univ. Prof. Mag. Dr. Martin Czejka für die Ermöglichung dieser Diplomarbeit und für die Geduld bei der Betreuung. Bei Frau Mag. Nairi Baroian bedanke ich mich für die hervorragende Unterstützung.

Vielen Dank an Herrn Mag. Dr. Philipp Buchner für seine stete Hilfsbereitschaft.

Meiner Studienkollegin Katharina Sagaischek bin ich für die Freundschaft und für die tolle Zeit während der Zusammenarbeit dankbar.

Ein großes Dankeschön gebührt natürlich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht haben, mich immer liebevoll unterstützt und in Prüfungszeiten mir Mut zugesprochen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwortlich, dass ich, Valerie Klug, die vorliegende Diplomarbeit selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe ausgeführt und verfasst habe, nur die angegebenen Quellen benutzt habe und diese als solche kenntlich gemacht wurden.

Die Arbeit wurde in dieser oder ähnlicher Form bis dato noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Wien, Mai 2014

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	III
Eidesstattliche Erklärung	IV
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Abkürzungen	VIII

1. Einleitung	1
1.1 Anthrachinone	1
1.1.1 Anthrachinone als etablierte Arzneistoffe	1
1.1.2 Anthrachinonderivate in der Forschung	2
1.2 Gewebsbindung	7
1.2.1 Bindung an Lebermikrosomen	8
1.2.2 Intestinale Bindung	11
2. Zielsetzung der Diplomarbeit	13
3. Experimenteller Teil	13
3.1 Materialien und Geräte	13
3.1.1 Testsystem	13
3.1.2 Geräte und Materialien	15
3.1.3 Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.4 Analysierte Substanzen	17
3.1.5 HPLC Anlage	17
3.2 Methodik und Arbeitsvorgang	17
3.2.1 Herstellung der Eluenten	17
3.2.2 Probenvorbereitung	18
3.2.3 Arbeitsschritte mit den Transil Testkits	21

3.2.4 HPLC-Analyse	22
4. Auswertung	22
4.1 Software.....	22
4.2 Erklärung der ermittelten Ergebnisse.....	23
4.2.1 Beide Testkits	23
4.2.2 spezifische Werte für Microsomal Binding Kit.....	25
4.2.3 spezifische Werte für Intestinal Absorption Kit.....	25
4.3 Ergebnisse.....	26
4.3.1 Microsomal Binding Kit	27
4.3.2 Microsomal Binding Kit – low affinity compounds.....	51
4.3.3 Intestinal Absorption Kit	60
4.3.4 Chromatogramme von SL14 als Beispiel	93
5. Zusammenfassung	95
6. Summary	97
7. Conclusio	99
8. Literatur	100
9. Anhang	103
9.1 Raw data	103
9.1.1 Microsomal Binding	103
9.1.2 Microsomal Low Binding.....	104
9.1.3 Intestinal Absorption	105
9.2 Curriculum vitae	107

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Anthrachinon.....	1
Abbildung 2: Anthrachinonderivate aus Alternaria sp.	3
Abbildung 3: Anthrachinonderivate aus Ampelomyce sp.	4
Abbildung 4: Alterporriol L, aus Alternaria sp. ZJ9-6B	4
Abbildung 5: Neue Anthrachinonderivate aus Alternaria sp.	5
Abbildung 6: Altersolanol P	6
Abbildung 7: Metabolisierung durch CYP	10
Abbildung 8: Der resorbierte Anteil als Funktion von P_{int} für neutrale Substanzen und für basische und saure zusätzlich als Funktion ihres pK_a -Wertes.	12
Abbildung 9: $\log P_{int}$ bei 50% Resorption als Funktion von Magenentleerungszeit (gastric emptying time) und Darmpassagezeit (intestinal transit time)	12
Abbildung 10: Reihe des Transil-Testkits.....	14
Abbildung 11: Reihen des Transil-Testkits, beiliegend der "Decapper" zum Öffnen der Reaktionskammern.....	15
Abbildung 12: Grundkörper der SeaLife-Verbindungen	17
Abbildung 13: Aussehen der Stammlösungen	20
Abbildung 14: Plattenschüttler.....	21

Abkürzungen

ACN	Acetonitril
AUFS	<i>area under full scale</i>
bzw.	beziehungsweise
Cl _{int}	intrinsische Clearance
CYP	Cytochrome-P450-Monooxygenasen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i>
Doxo	Doxorubicin
E. coli	Escherichia coli
G+	grampositiv
H ₂ O	Aqua bidestillata
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IC ₅₀	<i>half maximal inhibitory concentration</i>
Intest 1-6	Reaktionskammer 1-6 des Intestinal Absorption Kit
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
LogP _{int}	Logarithmus des Permeabilitätskoeffizienten
MA	Membranaffinität
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht [g/mol]
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i>
Micro 1-6	Reaktionskammer 1-6 des Microsomal Binding Kit
min	Minuten
MRSA	Methicillin-resistenter-Staphylococcus aureus
nfkb	<i>Nuclear factor KappaB</i>
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i>
P _{int}	<i>Intestinal permeability coefficient</i>
PRRSV	<i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>
Ref	Referenz
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
rpm	<i>Revolutions per minute</i>
TAD	Trizyklische Antidepressiva
Upm	Umdrehungen pro Minute
Vd	<i>Volume of distribution</i>
VRE	Vancomycin-resistente-Enterokokken

1. Einleitung

1.1 Anthrachinone

Anthrachinone gehören zu den Anthracenderivaten, dessen Grundkörper das trizyklische Anthracen bildet.

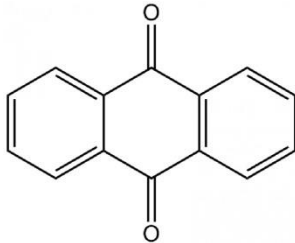


Abbildung 1: Anthrachinon [pharmawiki 2014]

Anthrachinone, auch als Anthranoide bezeichnet, sind in der Natur weit verbreitet. Sie kommen in Pilzen, Flechten, höheren Pflanzen und in der Insektenwelt vor. Bei den Familien Rubiaceae, Rhamnaceae, Leguminosae, Verbenaceae, Polygonaceae und Liliaceae dienen die Anthranoide als Pigmente. Die färbende Eigenschaft dieser Verbindungen macht man sich in der Lebensmittel-, Kosmetik- und Textilindustrie zu Nutze [Longo 2000, Welsch 2004].

1.1.1 Anthrachinone als etablierte Arzneistoffe

Als Arzneistoffe haben Anthrachinone vielfältige Wirkungen:

- laxativ
- sedativ
- antimikrobiell
- zytotoxisch

[pharmawiki 2014]

Anthranoide in Rhabarber, Aloe, Senna, Amerikanischer Faulbaum und Kreuzdorn sind für deren Einsatz als Laxantien verantwortlich. Voraussetzung für die abführende Wirkung sind die Ketogruppen im mittleren Ring sowie die Hydroxylgruppen in Position 1 und 8 am Ringsystem. Die in der Pflanze gebildeten Anthrone bzw. die tautomeren Anthranole liegen als Glykoside vor. Diese Formen gelten zusammen mit den Dianthronen als eigentliche Wirkform. Anthrachinone stellen die oxidierte Form dar; sie sind stabil und orange bis rot gefärbt [Wagner 1999].

Neben dem Haupteinsatzgebiet als Laxantien, sind Anthrachinonderivate auch erfolgreich als Chemotherapeutika im Einsatz. Die aus *Streptomyces*-Arten isolierten Anthracycline Daunorubicin und Doxorubicin sowie die synthetisch hergestellten Analoga Epirubicin und Idarubicin werden als Zytostatika bei verschiedenen Krebserkrankungen angewandt. Diese Anthracycline interkalieren dank ihrer planaren Struktur in die DNA und behindern die Topoisomerase 2 in ihrer Funktion, es resultieren Strangbrüche und in weiterer Folge kommt es zur Apoptose. Aufgrund des Redoxpotentials der Chinongruppe entstehen freie Sauerstoffradikale, die infolge Nucleinbasen oxidieren [Freissmuth 2012].

Durch die Verhinderung der Transkription erklärt sich auch die antibiotische Aktivität der Anthrachinone.

1.1.2 Anthrachinonderivate in der Forschung

In den letzten Jahren ziehen die Anthrachinone besonders wegen ihrer antimikrobiellen Aktivität Aufmerksamkeit auf sich. Die zunehmende Resistenzentwicklung vieler Erreger gegen existierende Antibiotika führt zur Suche nach Alternativen und neuen Leitstrukturen aus der Natur. Im Bereich der Antikrebswirkstoffe bereiten Resistenzen ebenfalls Sorgen, deshalb ist die Entdeckung neuer Chemotherapeutika auch für die Krebstherapie wünschenswert. Dabei sind Pflanzen und marine Organismen von großer Bedeutung. Sie haben bereits in einigen Studien bewiesen, dass sie eine vielversprechende Quelle im Kampf gegen Bakterien und Krebs sind.

Problematisch sind die sogenannten Hospitalismuskeime, mitunter MRSA, penicillinresistenter *Streptococcus pneumoniae* und VRE [Aly 2008]. Erschreckend ist, dass das Spektrum der Erreger nosokomialer Infektionen immer breiter wird. Neben den zuerst genannten grampositiven Bakterien, haben sich durch Resistenzentwicklung auch weitere gramnegative Bakterien (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), Viren (respiratorische Viren, Rotaviren, Noroviren) und Pilze (*Candida*, *Aspergillus*) zu einem ernstzunehmenden Problem entwickelt [Richter-Kuhlmann 2014].

Wichtige Produzenten bioaktiver Anthrachinone und Derivate sind endophytische Pilze. Gemeinsames Charakteristikum dieser Pilze ist ihr Leben als Parasiten oder Saprophyten auf Pflanzen. Zu dieser Familie gehören die *Alternaria* Arten, eine zu den Schimmelpilzen zählende Gattung, die ubiquitär verbreitet sind und auch oft auf Obst und Gemüse leben [Kück 2009]. *Alternaria solani*, bekannt als Erreger der Dürrfleckenkrankheit bei Kartoffeln, ist Namensgeber der Altersolanole. Aus dieser Art

wurde erstmals 1969 das Anthrachinon Altersolanol A isoliert. Aber auch in anderen *Alternaria*-Spezies und anderen Gattungen endophytischer Pilze wurden Altersolanole und Derivate entdeckt [Europäische Patentschrift 2010]. Für Altersolanol A wurde eine zytotoxische und zytostatische Wirkung bei chronischer myeloischer Leukämie und gegen Lungenkrebszellen, sowie eine entzündungshemmende Wirkung, nachgewiesen. Es löst Apoptose in Tumorzellen aus und hemmt die Transkription von *nfkB* [Teiten 2013]. Für die Krebstherapie sind Altersolanole insofern bedeutend, da einige Vertreter über eine potente Angiogenesehemmung vermögen. Das Anthrachinon Macrosporin und zwei hydroxylierte Vertreter aus *Alternaria* sp. wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf die Angiogenese untersucht.

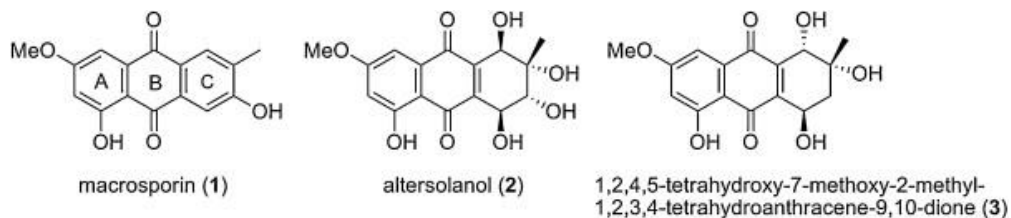


Abbildung 2: Anthrachinonderivate aus *Alternaria* sp. [Pompeng 2013]

Die Komponenten 2 und 3 unterdrücken die Angiogenese vollständig, während das Anthrachinonderivat 1 nur eine sehr schwache Wirkung auf die Blutgefäßneubildung zeigt. Das Ergebnis der Untersuchung legt nahe, dass komplett aromatisierte Systeme, sowie das Fehlen von Hydroxygruppen am Ring C, das Potential zur Angiogenesehemmung mindern. [Pompeng 2013].

Überdies ist Altersolanol A antibiotisch wirksam. Es fungiert als Elektronenakzeptor in der Bakterienmembran und hemmt so das Wachstum von Bakterien. Die Zytotoxizität dürfte folglich nicht alleiniger Grund für die antibiotische Wirkung sein.

Bei den Verbindungen Altersolanol A und 3-O-Methylalaternin, beide aus *Ampelomyces* sp. isoliert, beobachtet man eine starke Aktivität gegen die grampositiven Keime *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Enterococcus faecalis* mit einer MIC von 12,5 – 25 µg/ml und 12,5 µg/ml [Aly 2008].

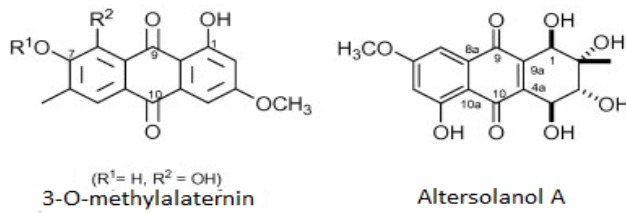


Abbildung 3: Anthrachinonderivate aus *Ampelomyce* sp. [Aly 2008]

Altersolanol A setzte den Startpunkt für die weitere Auseinandersetzung mit Anthrachinonderivaten als mögliche Arzneistoffkandidaten für die antibiotische Therapie oder für die Krebstherapie.

Interessant in der Krebstherapie sind auch Bianthrachinonderivate, welche über eine C2-C2' Brücke zu Dimeren verknüpft sind. Im Jahr 1984 wurde zum ersten Mal von Bianthrachinonderivaten, die auch als Alterporriol Familie bezeichnet werden, aus *Alternaria porri* berichtet [Huang 2011]. Alterporriol L, ein neu entdecktes Bianthrachinon aus einem marinen Pilz der Gattung *Alternaria*, wurde auf seine Zytotoxizität auf Brustkrebszellen untersucht. In den mit Alterporriol behandelten Zellen kommt es durch die vermehrte ROS-Produktion zur Steigerung des oxidativen Stresses und folglich zur Apoptose und zu nekrotischen Veränderungen in Krebszellen [Huang 2012].

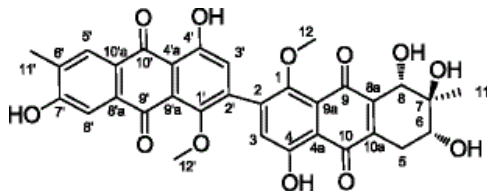


Abbildung 4: Alterporriol L, aus *Alternaria* sp. ZJ9-6B [Huang 2012]

Der Pilz *Alternaria* sp. wurde auch in der Weichkoralle *Sarcophyton* sp. im Südchinesischen Meer entdeckt. Ein Extrakt aus der Pilzkultur wirkt antibakteriell gegen die pathogenen Bakterien *E. coli* und *Vibrio parahemolyticus*. Der antibakterielle Effekt ist auf die Verbindungen Altersolanol C (8), Macrosporin (11) und Alterporriol C (17) zurückzuführen. Aus der Kulturbrühe und dem Mycel des Pilzes wurden neben diesen bereits bekannten Verbindungen, noch weitere bisher unentdeckte Anthrachinonderivate isoliert.

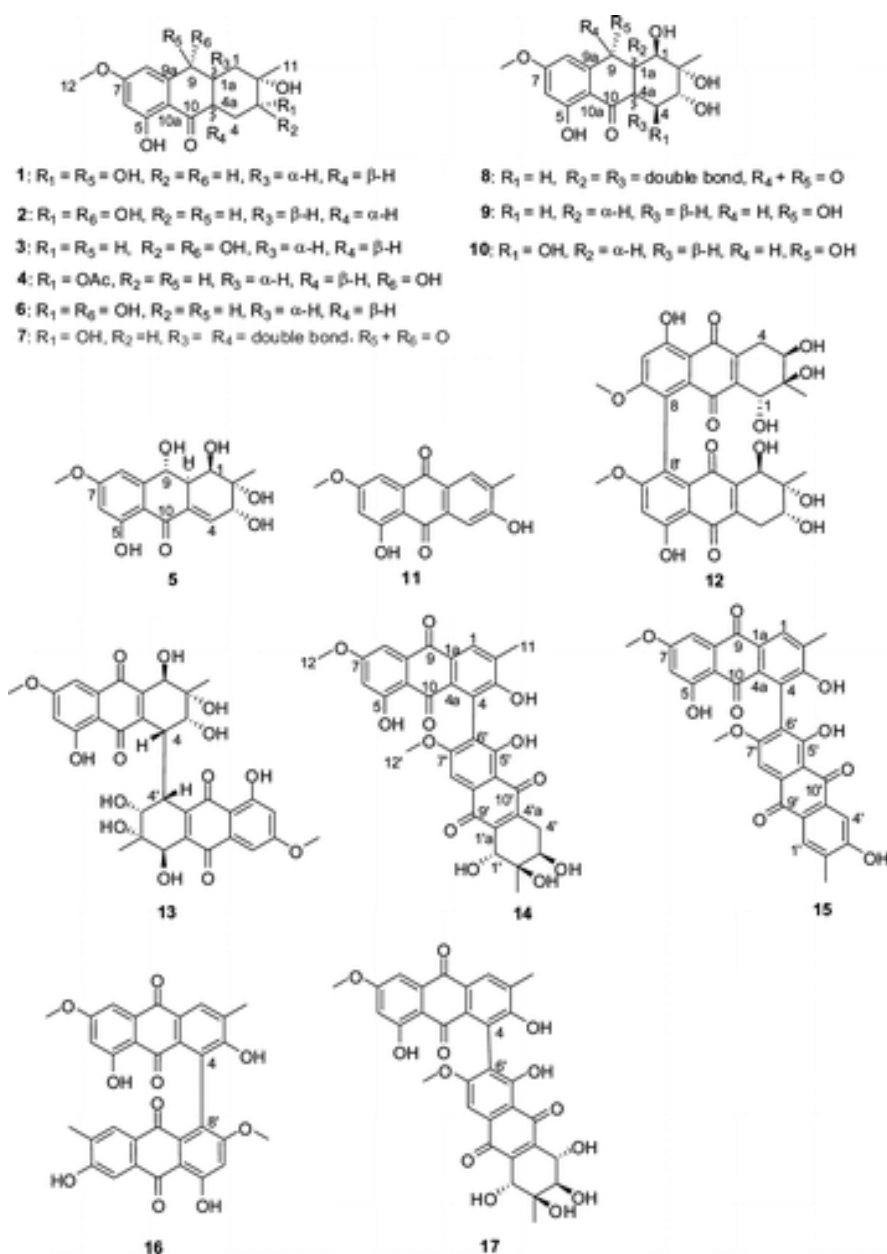


Abbildung 5: Neue Anthrachinonderivate (1-5, 12-16) aus *Alternaria* sp. [Zheng 2012]

Tetrahydroaltersolanol C (1), Alterporriol Q (15) und Alterporriol C (17) wirken antiviral gegen PRRSV und Alterporriol P (14) zytotoxisch.

Die Komponenten 1-10, 12-14 und 17 wurden auf Zytotoxizität gegen menschliche Kolonkarzinom-, Brustkebs-, Prostatakrebs- und Hepatomzellen untersucht. Altersolanol C (8) ist beachtlich zytotoxisch auf alle fünf getesteten Zelllinien mit einer IC_{50} von 2,2 - 8,9 μM . Die Hydroanthrachinonderivate 1-7, 9, 10 mit oxidiertem C10 und reduziertem C9 sind inaktiv ($\text{IC}_{50} > 100\mu\text{M}$). Das bestätigt die Bedeutsamkeit der Parachinonstruktur für eine zytotoxische Aktivität [Zheng 2012].

Aus einem bisher unbekannten Pilz, der im Blattlaub in Puerto Rico entdeckt wurde, isolierte man kürzlich ein neues Tetrahydroanthrachinon: Altersolanol P.



Abbildung 6: Altersolanol P [Ondeyka 2014]

Diese neue Entdeckung in der Altersolanol Familie zeigt einen antiobiotischen Effekt gegen die grampositiven Problemkeime *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis* und *Enterococcus faecalis*, aber auch gegen das gramnegative Bakterium *Haemophilus influenzae*. Die MIC zur Wachstumshemmung ist mit 2 bis 8 $\mu\text{g/mL}$ durchwegs niedrig [Ondeyka 2014].

Die Schwierigkeit in der Forschung mit Anthrachinonderivaten liegt darin, dass man keine Voraussagen zur antiinfektiven Wirkung treffen kann, schon gar nicht lässt sich im Vorhinein abschätzen gegen welche Spezies von Mikroorganismen die Verbindung wirksam ist [EP 2435394 B1]. Das erfordert die genaue Untersuchung von in ihrer Struktur sehr ähnlichen Verbindungen, da eine Strukturähnlichkeit zu einer wirksamen Verbindung kein Garant für einen ebenfalls antiinfektiven oder zytostatischen Effekt ist.

Die Entwicklung neuer Substanzklassen von Antibiotika ist dringend notwendig. Für Pharmafirmen ein unattraktives Territorium, da auch bei neu entwickelten Antibiotika die Kurzlebigkeit aufgrund der natürlichen Resistenzenwicklung der Bakterien vorprogrammiert ist. Durch die enge Verknüpfung der Entwicklung neuer Arzneistoffe mit dem Profitdenken unserer heutigen Konsumgesellschaft, sind die Prioritäten auf Einsatzgebiete gerichtet, die einen längeren Gebrauch versprechen.

1.2 Gewebsbindung

Nach Aufnahme eines Arzneistoffes und Gelangen in die systemische Zirkulation, folgt die Verteilung im Blut. Neben der Bindung an Plasmaproteine, können sich viele Arzneistoffe auch an eine Vielzahl von Gewebeproteinen binden:

- kontraktile Proteine der Muskulatur
- Erythrozyten
- Rezeptoren
- Glutathion-S-Transferase in der Leber usw.

Je nach physikochemischen Eigenschaften besteht die Möglichkeit sich in die Phospholipiddoppelschicht von Membranen, wie Zellmembranen oder die Membran des Endoplasmatischen Reticulums, oder in Fettvakuolen einzulagern [Wehling 2011]. Quantitativ betrachtet ist die Gewebsbindung von größerer Bedeutung als die Plasmaproteinbindung, da allein die Muskulatur schon 40 % des Körpergewichtes ausmacht. Die Gewebsbindung beim Menschen ist jedoch experimentell schwer festzustellen, deshalb gibt es noch wenig Information darüber. Ein Rückschluss von der Plasmaproteinbindung auf die Gewebsbindung ist meist nicht möglich [Aktories 2005].

Ein bedeutender Indikator für das Ausmaß der Verteilung eines Arzneistoffes in den Körperflüssigkeiten und im Gewebe ist das Verteilungsvolumen.

$$V_{d=\frac{D}{c_0}}$$

V_d ... Verteilungsvolumen [L]

D ... Dosis [mg]

c_0 ... Plasmakonzentration [mg/l] zum Zeitpunkt Null

Dieser theoretische Parameter sagt jedoch nichts über den eigentlichen Anreicherungsort eines Wirkstoffes aus. Zwei Arzneistoffe können dasselbe V_d aufweisen, wobei sich der eine hauptsächlich im Muskelgewebe, der andere im Fettgewebe anlagert.

Der Anteil der Körperflüssigkeit im menschlichen Körper gliedert sich in extrazelluläre und intrazelluläre Flüssigkeit und macht in etwa 60 % des Körpergewichtes aus. Für einen 70 kg schweren Menschen wären das 40 Liter. Eine starke Bindung eines Arzneistoffes an Gewebestrukturen führt zu einem Verteilungsvolumen, das ein Vielfaches des Körperwasservolumens einnimmt. Aufgrund der geringen Plasmakonzentration, errechnet man für das V_d höhere Werte als der tatsächliche wässrige Lösungsraum

zulässt. Je höher das Verteilungsvolumen eines Wirkstoffes, desto höher muss die Dosierung sein um die notwendige Konzentration am Wirkort zu erreichen [DiPiro 2010]. Dies kann besonders für Arzneistoffe mit einem ausgeprägten Nebenwirkungspotential zu Problemen führen.

Neben der Gewebsbindung nehmen auch die Plasmaproteinbindung und die Elimination einen Einfluss auf das Verteilungsvolumen. Arzneistoffe mit einer starken Affinität zu Gewebestrukturen, aber einer geringen Plasmaproteinbindung, zeigen im Gegensatz zu Arzneistoffen mit geringer Gewebsbindung und starker Plasmaproteinbindung, ein großes Vd. Beispiele hierfür sind lipidlösliche Wirkstoffe wie TAD und Umweltgifte [Galeazzi 1997].

1.2.1 Bindung an Lebermikrosomen

Lebermikrosomen erhält man durch Zerkleinern der Leber und anschließender Zentrifugation. Es handelt sich um Membranvesikel, die sich hauptsächlich aus zellulären Membranfragmenten des endoplasmatischen Reticulums zusammensetzen [Plattner 2011].

In der pharmakologischen Forschung werden meist Lebermikrosomen aus Ratten oder Primärhepatozyten verwendet. Die mikrosomale Bindung zeigt kaum einen Unterschied zwischen Mensch, Ratte, Hund und Affe [Austin 2002]. Kinetische Messungen mit Lebermikrosomen werden immer häufiger durchgeführt. Sie stellen eine Methode dar, um das Ausmaß der metabolischen Oxidation von Substanzen zu ermitteln und liefern wichtige Daten zur Vorhersage der Pharmakokinetik [Obach 1997].

In den Lebermikrosomen befinden sich Enzyme zur Biotransformation: Cytochrome-P450-Enzyme stellen die zentralen Elemente des oxidativen Phase-1-Metabolismus dar. Es handelt sich um mischfunktionelle Monooxygenasen, die eine Vielzahl von Funktionalisierungsreaktionen durchführen. Ihre Aufgabe ist es, polare Gruppen in das Molekül einzuführen oder freizulegen um die Ausscheidung zu erleichtern.

Dadurch können einerseits wirksame Metaboliten entstehen, wenn es sich um ein Prodrug handelt, andererseits in ihrer Wirkung stark abgeschwächte Metaboliten. Der Phase-1-Metabolismus zählt zusammen mit dem Phase-2-Metabolismus, bei dem die funktionellen Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen Molekülen verbunden werden, zum Entgiftungs- und Inaktivierungssystem des Körpers. Cytochrome-P450-

Enzyme kommen ubiquitär vor, in der Leber jedoch in höchster Konzentration [Aktories 2005].

In herkömmlichen Versuchsansätzen zur Erforschung der Clearance einer Substanz wird nicht berücksichtigt, dass die Wirkstoffkonzentration durch eine Bindung an Lebermikrosomen stark reduziert werden kann und somit die Substanz nicht in der Lage ist frei mit CYP zu interagieren. Deshalb gibt es zwischen der vorhergesagten hepatischen Clearance aus in-vitro Daten und der gemessenen Clearance in-vivo oft große Unterschiede. Zahlreiche weitere Faktoren wie der Metabolismus in extrahepatischen Geweben oder eine Fehleinschätzung des Verteilungsvolumens sind hierfür ebenfalls verantwortlich [User Guide Transil^{XL} Microsomal Bindung Kit 2012, McLure 2000].

Zahlreiche Studien bestätigen, dass die $Cl_{int,U}$ vieler Substanzen nicht der experimentell beobachteten Cl_{int} entspricht. Für beide Parameter besteht folgender Zusammenhang:

$$Cl_{int,U} = \frac{V_{max}}{K_m} = \frac{Cl_{int}}{f_{u_{inc}}}$$

$Cl_{int,U}$...	Intrinsische Clearance, ungebunden
Cl_{int} ...	Intrinsische Clearance, experimentell
V_{max} ...	maximale Geschwindigkeit
K_m ...	Michaelis Konstante
$f_{u_{inc}}$...	freier Anteil in der mikrosomalen Inkubation

[Austin 2002]

Die größte Konkordanz zwischen experimentell ermittelter in-vitro Clearance und in-vivo Clearance erhält man bei Berücksichtigung der Bindung an Lebermikrosomen und an Proteine des Blutes [Obach 1999].

Wenn die Clearance und das scheinbare Verteilungsvolumen einer Substanz vorhergesagt werden können, kann man auf die Halbwertszeit schließen und somit eine passende Dosierung des Wirkstoffes vornehmen.

Die Bindung eines Arzneistoffes an die mikrosomale Membran verringert dessen freie Wirkstoffkonzentration, die von CYP metabolisiert werden kann. Demnach bedeutet eine hohe Bindungsrate wenig Metabolisierung. Ist ein Arzneistoff für CYP nicht zugänglich, sinkt zugleich der Anteil des Wirkstoffes, der eventuell in der Lage ist dieselben zu hemmen. Folglich ist die Bestimmung der mikrosomalen Bindung eine wesentliche Korrekturmaßnahme bei der Einschätzung des Inhibitorpotentials eines Wirkstoffes. Wird diese Gegebenheit nicht berücksichtigt, wird das Potential eines

Wirkstoffes zur Enzymhemmung und in weiterer Folge die Gefahr einer Wechselwirkung mit anderen Wirkstoffen falsch eingeschätzt. [User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding Kit 2012].

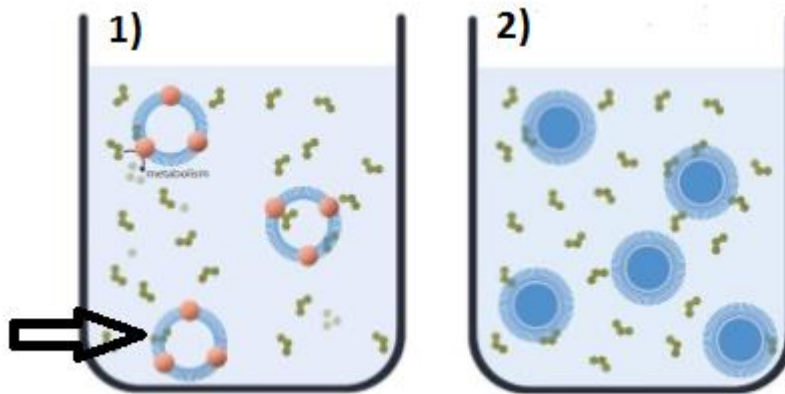


Abbildung 7: Metabolisierung durch CYP [User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding Kit 2012]

1) rote Objekte: CYP Enzyme, blaue Ringe: Membranvesikel, grüne Objekte: Wirkstoff, Pfeil: Wirkstoff, der an die mikrosomale Membran gebunden ist 2) Testsystem (Transil): simuliert die mikrosomale Membran (hellblaue Ringe), dunkelblaue Objekte: Trägermaterial

Die Stärke der Bindung an die Mikrosomen hängt unter anderem auch von der Konzentration an mikrosomalem Protein ab. Jedoch gibt es Arzneistoffe, deren Cl_{int} bei verschiedenen mikrosomalen Konzentrationen fast konstant bleibt. Bei den meisten gilt aber: Je höher die Konzentration an mikrosomaler Membran, desto stärker die Bindung und desto weniger kann von den Enzymen in den Lebermikrosomen metabolisiert werden.

Die Affinität zu den Lebermikrosomen nimmt im Allgemeinen mit der steigenden Lipophilie der Verbindung zu. Basische Substanzen zeigen jedoch bei gleicher Lipophilie eine stärkere Bindung zu Phospholipidmembranen als saure oder neutrale. Diese stärkere Affinität zu den Phospholipidmembranen ist auf eine begünstigte elektrostatische Interaktion zwischen der protonierten Base und den Phosphatgruppen der Phospholipide zurückzuführen.

Als Maß für die Lipophilie gilt der Verteilungskoeffizient: Je höher dieser ist, desto größer ist die Membranaffinität [Austin 2000].

Die Membranaffinität wird daher durch den Verteilungskoeffizienten zwischen Membran und Puffer angegeben:

$$MA = \frac{cl}{cb}$$

cl... Konzentration in der Lipidphase
cb...Konzentration in der Pufferphase

[User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding Kit 2012]

Amphiphilie könnte eine Voraussetzung für die Membranaffinität zu den Mikrosomen sein, da auch die Phospholipide der Membranen diese Eigenschaft aufweisen. Eine starke Bindung zeigen Substanzen mit einer geladenen Aminogruppe in Kombination mit einem multiplen aromatischen oder zyklischen hydrophoben Teil [Hallifax 2006].

Interessant ist, dass die unspezifische Bindung an Mikrosomen nicht von der Substanzkonzentration abhängig zu sein scheint und dass es bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen zu keiner Sättigung der Bindung kommt [Austin 2002].

1.2.2 Intestinale Bindung

Die Resorption eines peroral verabreichten Stoffes ist ein komplexer Prozess, der von vielen Faktoren abhängig ist:

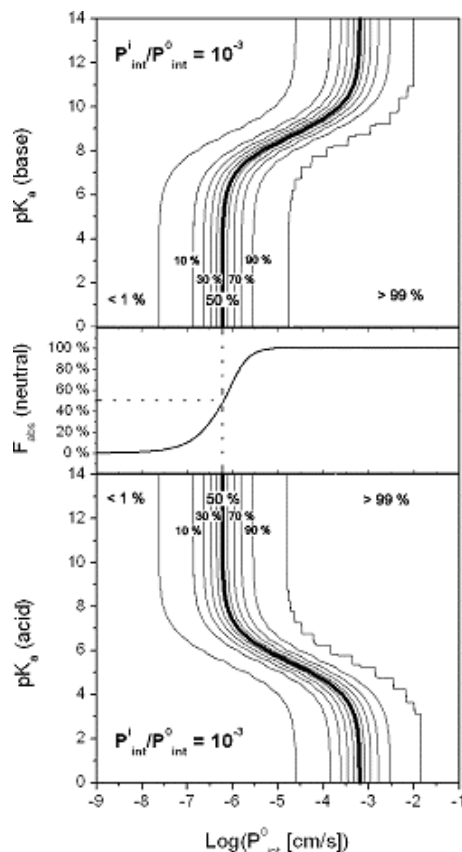
- physiologische Eigenschaften des GI-Traktes: Durchmesser, Länge, Fläche, pH-Wert, Geschwindigkeit der Magenentleerung, Verweildauer im GI-Trakt
- physikochemische Eigenschaften des Arzneistoffes: Löslichkeit, Permeabilitätskoeffizient

Mangelnde Löslichkeit oder ein geringer Permeabilitätskoeffizient senken die Bioverfügbarkeit eines Arzneistoffes, ebenso ein Metabolismus in der Darmwand oder Leber oder wenn sich der Arzneistoff im intestinalen Milieu zersetzt. Die Bioverfügbarkeit beschreibt den Anteil, der tatsächlich die systemische Zirkulation erreicht. Arzneistoffkandidaten mit einer guten Bioverfügbarkeit haben größere Chancen auf einen erfolgreichen Einsatz also solche mit einer geringen. Natürlich spielt später die Arzneiform eine wesentliche Rolle bei der Bioverfügbarkeit.

Der Magen hat wegen seiner kleinen Fläche und der kurzen Verweildauer seines Inhaltes für die Resorption eine untergeordnete Bedeutung. Hingegen fungiert der Dünndarm mit seiner großen Fläche und starken Vaskularisation als Hauptresorptionsort. Viele Pharmaka werden bereits im Dünndarm vollständig resorbiert und gelangen kaum noch in den Dickdarm. Eine Ausnahme stellen Retardarzneiformen dar, welche im

Dickdarm noch große Mengen des Arzneistoffes freisetzen können. Obwohl die Fläche des Dickdarms klein ist und Mikrovilli (Bürstensaum) in der Dickdarmmukosa fehlen, kann es wegen der langen Verweildauer zu einer beachtlichen Resorption kommen, die in manchen Fällen mit der Resorption im Dünndarm vergleichbar ist [Aktories 2005, Willmann 2004].

Der resorbierte Anteil einer Substanz ist vom Permeabilitätskoeffizienten abhängig. Für neutrale Substanzen gilt: Die resorbierte Fraktion steigt sigmoidal mit $\text{Log}P_{\text{int}}$.



Bei sauren oder basischen Substanzen wird die Kurve je weiter verschoben je höher der ionisierte Anteil ist. Das führt dazu, dass Substanzen, die bei dem pH Wert im Intestinum stärker in der ionisierten Form vorliegen einen höheren Permeabilitätskoeffizienten benötigen um im selben Ausmaß resorbiert zu werden wie Substanzen, die überwiegend nicht geladen sind. Der Quotient von ionisiertem und nicht ionisiertem Anteil $P_{\text{int}}^i/P_{\text{int}}^o$ wird in Abb. 8 als 10^{-3} angenommen.

Abbildung 8: Der resorbierte Anteil als Funktion von P_{int} für neutrale Substanzen und für basische und saure zusätzlich als Funktion ihres pK_a -Wertes. [Willman 2004]

Wieviel von einer Substanz resorbiert wird, wird auch maßgeblich von der Geschwindigkeit der Magenentleerung und der Darmpassagezeit bestimmt.

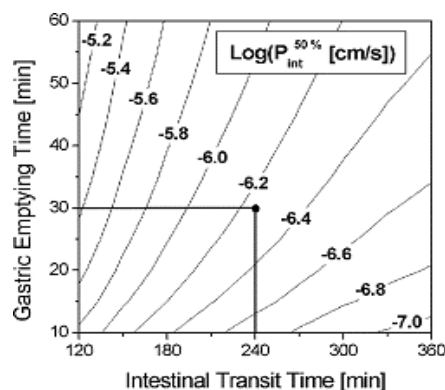


Abbildung 9: $\text{Log}P_{\text{int}}$ bei 50% Resorption als Funktion von Magenentleerungszeit (gastric emptying time) und Darmpassagezeit (intestinal transit time) [Willmann 2004]

Eine schnelle Magenentleerung und eine langsame Darmpassage führen zu hohen Permeabilitätskoeffizienten und vice versa. Physiologische Durchschnittswerte beim Menschen entsprechen etwa 30 min für die Verweildauer im Magen und 4 h für die Verweilzeit im Darm. Eine Veränderung der physiologischen Parameter kann eine drastische Auswirkung auf die Resorption eines Arzneistoffes haben.

Die Resorption ist von Individuum zu Individuum unterschiedlich, da die physiologischen Parameter natürlich variieren und stark durch die Nahrung beeinflusst werden.

Wenn der Permeabilitätskoeffizient und die Löslichkeit einer Substanz bekannt sind, kann man Vorhersagen bezüglich der Resorption treffen und abschätzen ob es Probleme bei der Bioverfügbarkeit geben wird. Der Vorteil dieser beiden Parameter ist die Substanzspezifität und damit führen in präklinischen Studien mit Ratten die Unterschiede in der Physiologie des GI-Traktes von Ratte und Mensch zu keinen Schwierigkeiten und müssen nicht eigens berücksichtigt werden [Willmann 2004].

2. Zielsetzung der Diplomarbeit

Ziel dieser Diplomarbeit war, die Bindung neuer Anthrachinone an mikrosomale und intestinale Membranen zu untersuchen und dadurch mehr über ihre Pharmakokinetik zu erfahren. Bei den verwendeten Anthrachinonen handelt es sich um neue bisher unerforschte Substanzen mit antibiotischer Wirkung, die vom Unternehmen Sealife Pharma[®] im Rahmen eines Projektes mit dem Department für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien zur Verfügung gestellt wurden.

3. Experimenteller Teil

3.1 Materialien und Geräte

3.1.1 Testsystem

- Transil^{XL} Microsomal Binding Kit

Hersteller: Sovicell GmbH, Deutschland

Produktnummer: TMP-0120-2096

Lot No.: GHKU

Mit diesem Testkit kann die Affinität von Substanzen zu mikrosomalen Membranen festgestellt werden.

- Transil^{XL} Microsomal Binding Kit – low affinity compounds

Hersteller: Sovicell GmbH, Deutschland

Produktnummer: TMP-0120-2196

LOT No.: CMRY

Dieser Kit eignet sich für Substanzen, die eine sehr geringe Membranaffinität haben ($\log MA < 2,5$). Die Komponenten sind ident zu denen des Microsomal Binding Kit, nur eine doppelt so hohe Lipidkonzentration wird hier verwendet.

- Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit

Hersteller: Sovicell GmbH, Deutschland

Produktnummer: TMP-0100-2096 und TMP-0100-1196

Lot No.: DJCN, Sovicell

Dieser Kit dient zur Untersuchung der intestinalen Bindung von Substanzen.

Die Transil Platten enthalten Silicakugeln, die in Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert sind. Auf den Silicakugeln ist eine Lipiddoppelschicht aufgebracht. Eine Beschichtung mit einem Lipidextrakt aus Rinderleber und L- α -phosphatidylcholin aus dem Hühnerei simuliert die Membran der Lebermikrosomen. Sind die Kugeln nur mit letzterem beschichtet, wird die Membran des Darms nachgeahmt.

Eine Reihe der Transil-Platte umfasst 8 Reaktionskammern: 6 beinhalten eine jeweils unterschiedliche Anzahl an lipidbeschichteten Silicakugeln und damit unterschiedliche Membrankonzentrationen, 2 dienen als Referenz und enthalten nur Puffer.

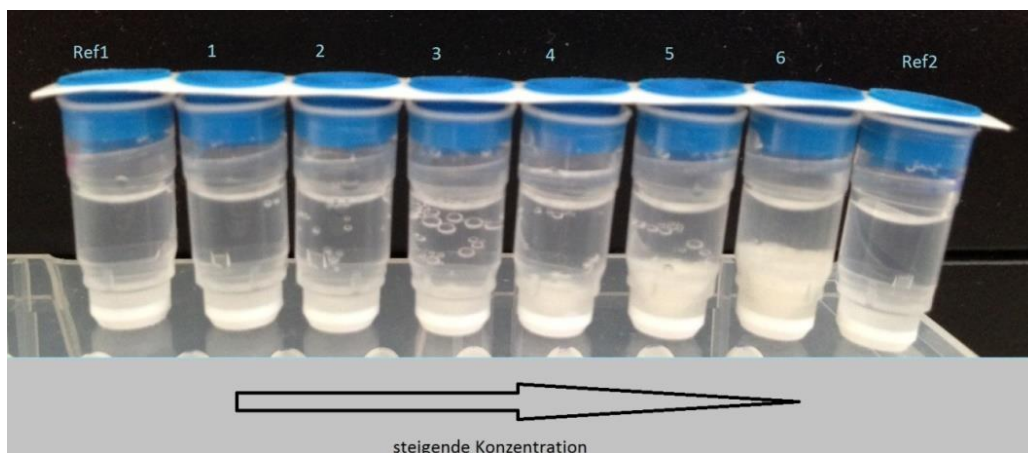


Abbildung 10: Reihe des Transil-Testkits

Eine komplette Platte besteht aus 12 Reihen zu jeweils 8 Reaktionsbehältnissen. Für einen Testdurchgang mit einer Substanz benötigt man eine komplette Reihe.

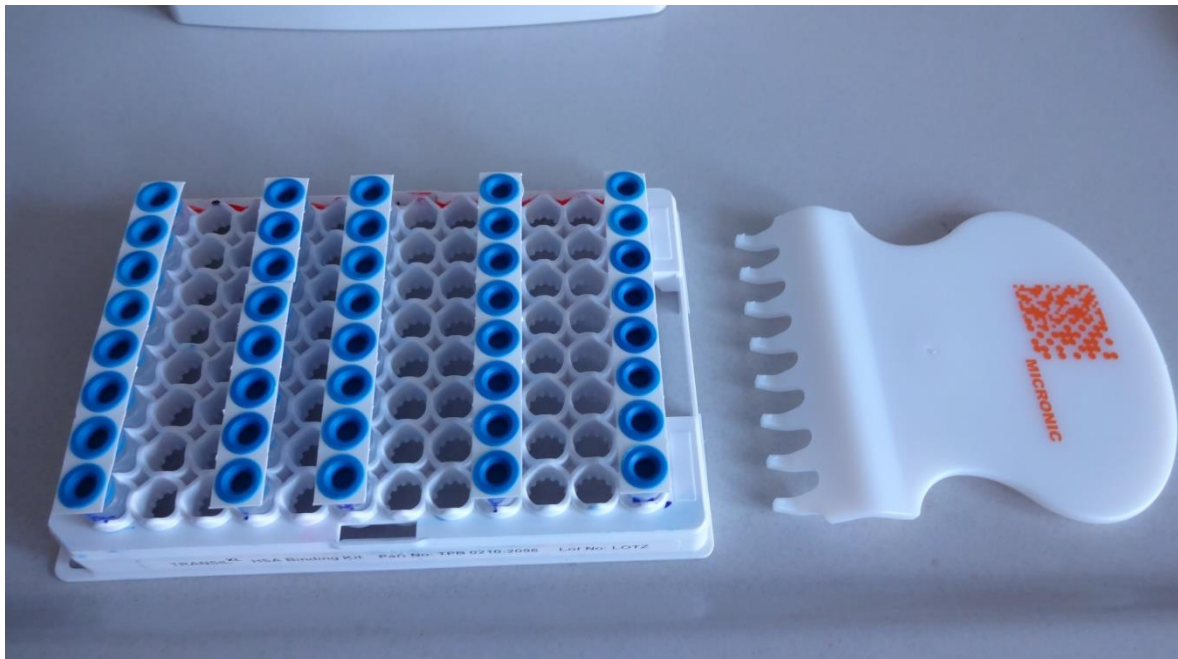


Abbildung 11: Reihen des Transil-Testkits, beiliegend der "Decapper" zum Öffnen der Reaktionskammern

3.1.2 Geräte und Materialien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Analysenwaage: Sartorius H110	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Braunglasfläschchen für HPLC	biolab
Caps (HPLC): 8-SC	Chromacrol®
Decapper	Micronic
Eppendorf Pipetten: Eppendorf Research 2-20µl; 100-1000µl	Eppendorf A
Eprouvetten: 100 x 16 mm	Assistent Deutschland
Magnetrührer: MR 3001 K	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG
Messkolben 50 ml	
Microeinsätze	biolab

Mini-Shaker: Vortex	Mixer VELP® SCIENTIFICA
Pasteurpipetten aus Glas: 150mm Gesamtlänge	Assistent Deutschland
pH-Meter: ORION 2 STAR pH Benchtop	Thermo Scientific
Pipettensauger	
Pipettenspitzen: Universal blue Tipps 50-1000µl, Universal yellow Tipps, 2-200µl	VWR®INTERNATIONAL
Plate Shaker: Mix Mate PCB-11	Eppendorf
Septum für Sampler-Fläschchen: 8-ST15	CHROMACROL® biolab
Ultraschallbad: BANDELIN SONOREX RK 150	BANDELIN electronic GmbH Co. KG
Vials (HPLC): p336	CHROMACROL®
Waage: Sartorius M-prove AY612	Sartorius Mechatronics Austria GmbH
Zentrifuge: Labofuge 400 FUNCTION Line	Heraeus Instruments GmbH

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Acetonitril	Merck KG
Aqua bidestillata	Department für Pharmakognosie Universität Wien
Dimethylsulfoxid 100% D8418 (100ml)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogenphosphat 99%	Sigma-Aldrich
Methanol	Merck KG
PBS Tabletten P4417-50TAB	Sigma-Aldrich
Phosphorsäure 85%	Sigma-Aldrich

3.1.4 Analyisierte Substanzen

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
SL 1-14*	SeaLife Pharma® GmbH, Tulln

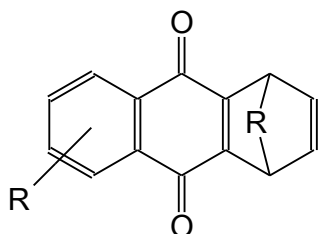


Abbildung 12: Grundkörper der SeaLife-Verbindungen

*genaue Struktur patentrechtlich geschützt

Doxorubicin, Ch-Nr.: 40157001	Ebewe Pharma (Novartis)
-------------------------------	-------------------------

3.1.5 HPLC Anlage

VWR Hitachi Chromaster

Pumpe: 5110	Flussrate: 0,8 ml/min
Autosampler: 5210	Temperatur: 10 °C
	Injektionsvolumen: 40 µl
	Druck: 85 bar
Säulenofen: 5310	Temperatur: 36 °C
UV-Detektor: 5410	single wave length modus
Organizer	
Entgaser	kontinuierliche Entgasung
Software	Chromaster System Manager
PC	HP Compaq 6200 Pro Small Formfactor
Waschflüssigkeit HPLC	H2O:ACN = 20:80 %V/V

3.2 Methodik und Arbeitsvorgang

3.2.1 Herstellung der Eluenten

KH₂PO₄ wird in die entsprechende Menge Aqua dest. eingewogen und anschließend wird die Lösung auf dem Magnetrührer mit 8,5 % Phosphorsäure mithilfe des pH-Meters auf einen pH-Wert von 4,4 eingestellt. Anschließend wird das Acetonitril hinzugefügt und das

Gemisch zur guten Homogenisierung noch weiter am Magnetrührer gerührt. Der Eluent wird für etwa 30 min im Ultraschallbad entgast.

Eluent Isokratisch 1: H₂O:ACN 40:60 %V/V

0,8 g KH₂PO₄

800 ml Aqua dest.

ca. 120 µl 8,5 % Phosphorsäure

200 ml ACN

Eluent Isokratisch 2: H₂O:ACN 60:40 %V/V

0,4 g KH₂PO₄

600 ml Aqua dest.

ca. 70 µl 8,5 % Phosphorsäure

400 ml ACN

Eluent für Doxorubicin:

0,5 g KH₂PO₄

500 ml Aqua dest.

250 ml ACN

250 ml MeOH

3.2.2 Probenvorbereitung

Herstellung einer 32% DMSO:

Reagentien: DMSO 100%, Dulbeccos's PBS

2 Tabletten Dulbecco's PBS werden in 400 ml Aqua dest. aufgelöst. 340 ml des Phosphatpuffers werden entnommen und mit 160 ml DMSO 100% am Magnetrührer gemischt.

Herstellung der Stammlösung:

Für jede Substanz wird eine Stammlösung mit 32% DMSO hergestellt. Das ergibt eine Konzentration von 2% DMSO in den einzelnen Reaktionskammern einer Reihe der Transil Platte. Eine höhere DMSO Konzentration kann zu falschen Ergebnissen bezüglich der Bindungsstärke führen. Die Endkonzentration der Substanz in den einzelnen Reaktionskammern hängt von der Löslichkeit und der analytischen Methode ab, sollte

jedoch maximal 5µM sein; das erfordert die Herstellung einer 80µM Stammlösung. [User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding Kit 2012]

Berechnung der Einwaage x :

1 mol MG

1µmol MG

80µmol x

$$x = \frac{80 \times MG}{1000} \text{ mg/l}$$

$$\text{Einwaage für 50 ml: } x = \frac{80 \times MG}{20000} \text{ mg/50 ml}$$

→ EW + 50 ml DMSO 32%

Für einen kompletten Testdurchgang (Microsomal Binding Kit, Microsomal Low Binding Kit, Intestinal Absorption Kit, AGP¹ Binding Kit, PPB¹ Binding Kit, HSA¹ Binding Kit) werden nur etwa 720 µl benötigt. Um eine sinnvolle Einwaage zu ermöglichen, wird auf größere Volumina (mind. 50 ml) gerechnet.

¹ von Kollegin Sagaischek Katharina im Rahmen ihrer Diplomarbeit bearbeitet

Substanzname	MG [g/mol]	Berechnete Einwaage [mg/50ml]	Löslichkeit in 32% DMSO & Aussehen der Lösung
SL5	268	1,07	schwer löslich, 40 min Ultraschallbad; zart orange
SL4	359	1,44	löslich, hellbraun, nicht stabil! Lichtschutz, trotzdem mit der Zeit immer dunkler bis schwarz, schwefeliger Geruch
SL3	395	1,58	löslich, dunkelgelb, mit der Zeit heller
SL1	240	0,96	schwer löslich, 1h Ultraschallbad, Gelbstich
SL2	242	0,97	schwer löslich, 1h Ultraschallbad; gelb
SL6	282	1,13	leicht löslich, gelb
SL7	404	1,62	löslich, blass gelb, nach jeder Transil Reihe gut schütteln da Partikel am Boden
SL14	418	1,67	leicht löslich, hellgelb

SL8	376	1,50	leicht löslich, gelb, entfärbt sich mit der Zeit (nach ca. 3h)
SL9	420	1,68	leicht löslich, hellgelb
SL10	382	1,53	löslich, hellgelb, entfärbt sich mit der Zeit
SL11	395	1,58	leicht löslich, hellgelb
SL12	270	1,08	schwer löslich, 2h Ultraschallbad; hellorange
SL13	703	2,81	schwer/nicht löslich; Versuch mit DMSO 60% → besser löslich, gelb, leicht trüb, nach 1h heller
Doxorubicin	580	2,32	leicht löslich, rotorange

Die eingewogene Substanz wird zunächst in einer Eprovette mit etwa 5 ml 32% DMSO versetzt. Die Lösung wird je nach Löslichkeit der Substanz auf dem Vortexer geschüttelt und anschließend für eine bestimmte Dauer in das Ultraschallbad gehängt. Danach wird in einem Messkolben auf 50 ml aufgefüllt und die Lösung nochmals ins Ultraschallbad gestellt.

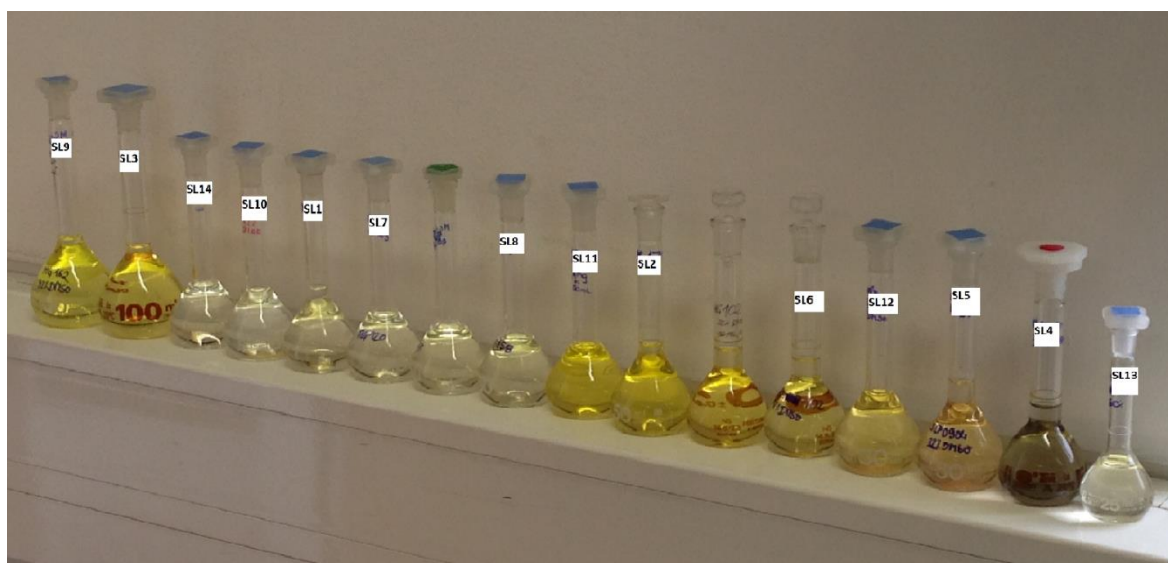


Abbildung 13: Aussehen der Stammlösungen

Aufgrund des chromophoren Systems sind die Anthrachinone gelb bis rot-orange, dementsprechend die Lösungen gefärbt. Eine Ausnahme bietet die Verbindung SL4, die offensichtlich nicht stabil ist. Die Substanz selber sowie die Lösung in 32% DMSO ist braun und wird mit der Zeit immer dunkler.

Es wird mit allen Testsubstanzen unter Lichtschutz gearbeitet.

3.2.3 Arbeitsschritte mit den Transil Testkits

Dem User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding/Intestinal Absorption Kit 2012 entnommen.

- Auftauen der Platten

Die Transil Kits werden bei -20 °C gelagert. Vor Gebrauch muss die gewünschte Anzahl an Reihen (pro Substanz eine Reihe) aufgetaut werden. Hierzu wird sie vom Rest des Kits abgetrennt und wahlweise 3 Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht im Kühlschrank aufgetaut.

Die Platte wird 5 Sekunden bei 2100 Upm (750g) zentrifugiert um den Inhalt am Boden zu sammeln.

Vor Beginn der Probenzugabe muss sichergestellt sein, dass die Platte Raumtemperatur (20 – 25 °C) hat.

- Bereitung der Stammlösung

Siehe Probenvorbereitung 3. 2. 2

- Arzneistoffkandidat Zugabe

Jeweils eine Reihe des Testkits wird mit dem mitgelieferten „Entkapper“ geöffnet. Von der Stammlösung werden jeweils 15 µl in die Reaktionskammern pipettiert. Nach jeder Zugabe wird die Pipettenspitze gewechselt um eine Verschleppung in den nächsten Reaktionsbehälter zu vermeiden. Das Deckelband wird in derselben Orientierung wie vor dem Abnehmen wieder aufgesetzt.

- Inkubation und Probenentnahme

Die Platte wird am Plattenschüttler bei 1000 rpm für 12 Minuten inkubiert.



Abbildung 14: Plattenschüttler

Danach wird in der Zentrifuge bei 2100 Upm für 10 Minuten zentrifugiert um die Phasentrennung zwischen den lipidbeschichteten Silicakugeln (Adsorbens) und der wässrigen Pufferphase zu beschleunigen.

Die Reihen werden mit dem Entkapper geöffnet. Im Überstand kann der freie, nicht adsorbierte Anteil der Testsubstanz mittels HPLC bestimmt werden. Dazu werden jeweils 50-100 µl des Überstandes entnommen und in Microeinsätze für Braunglasfläschchen pipettiert. Für jede Entnahme wird eine frische Pasteurpipette verwendet.

3.2.4 HPLC-Analyse

Substanz	Säule	Eluent	Wellenlänge [nm]	Retentionszeit [min]
SL5	ACE	Isokratisch 1	270	7,2
SL4	ACE	Isokratisch 2	270	3,1
SL3	ACE	Isokratisch 2	270	5,6
SL1	ACE	Isokratisch 1	270	5,2
SL2	ACE	Isokratisch 1	270	5,6
SL6	ACE	Isokratisch 1	270	4,5
SL7	ACE	Isokratisch 1	270	5,6
SL14	Nukleosil	Isokratisch 1	270	4,6
SL8	ACE	Isokratisch 1	270	4,3
SL9	Nukleosil	Isokratisch 1	270	7,4
SL10	ACE/Nukleosil	Isokratisch 1	270	7,5/10,5
SL11	ACE/Nukleosil	Isokratisch 1	270	3,5/4,7
SL12	ACE	Isokratisch 1	270	7,9
SL13	ACE	Isokratisch 1	270	5,3
Doxorubicin	LiChrospher 100Rp 18 ec	Eluent für Doxorubicin	485	3,2

4. Auswertung

4.1 Software

Für die Auswertung wurden folgende Programme verwendet:

- Chromaster System Manager zur Steuerung der HPLC und Auswertung der Chromatogramme
- Transil^{XL} Microsomal Binding Kit Kalkulationstabelle (Microsoft® Excel 2010)
- Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit Kalkulationstabelle (Microsoft® Excel 2010)
- Graph Pad Prism 6

Der erste Schritt ist die Eintragung der Parameter der Transil-Platte auf der „Main Page“. Danach können die aus der HPLC-Analyse erhaltenen Peakflächen in die „Raw Data“ Tabelle des Transil Excel Arbeitsblattes eingetragen werden (*Raw data siehe Anhang 9.1*). Für eine ausgewählte Verbindung werden mithilfe des Programmes Graph Pad Prism 6 die HPLC-Diagramme dargestellt, um den Zusammenhang zwischen Peakfläche und Lipidkonzentration in den einzelnen Reaktionskammern kenntlich zu machen. Doxorubicin als Testsubstanz Nr. 15 dient lediglich als Standard.

4.2 Erklärung der ermittelten Ergebnisse

[User Guide Transil^{XL} Microsomal Binding/Intestinal Absorption Kit 2012]

4.2.1 Beide Testkits

logMA: Logarithmus der Membranaffinität, kennzeichnet den Verteilungskoeffizienten zwischen Lipid- und Pufferphase

$$MA = \frac{c_l}{c_b}$$

c_l ... Konzentration in der Lipidphase

c_b ... Konzentration in der Pufferphase

Die Membranaffinität wird aus den ermittelten Daten mit der Massenbilanzgleichung ausgerechnet.

$$n_t = c_b \times V_b + c_l \times V_l \quad \text{daraus folgt:}$$

$$\frac{n_t}{c_b} = \frac{c_l}{c_b} \times V_l + V_b = MA \times V_l + V_b$$

n_t ... Gesamtmenge des Wirkstoffes

V_l ... Volumen der Lipidphase

V_b ... Volumen der Pufferphase

r^2 : Quadrat des Korrelationskoeffizienten = Determinationskoeffizient → Maßzahl für Stärke eines linearen Zusammenhanges. Je näher der Wert an 1, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein linearer Zusammenhang besteht, die unabhängigen Variablen erklären die abhängigen [Dubravko 2004.]

TQI (=QC Index): Transil Quality Index. Die Qualität des Testergebnisses wird mit einer Skala von 0-10, wobei 10 die höchste Qualität bedeutet, bewertet. Beurteilt werden voneinander unabhängige Messungen:

- Zahl der Datenpunkte, die verwendet werden können (maximal 6)

- Abweichung (%) der durch die HPLC-Analyse ermittelten Peakflächen der Referenzen von den vorausgesagten (Reference check)
- r^2 bei MA Estimation
- Abweichung der Referenzen untereinander
- Unterschied der Referenzsignale zu den Signalen in den Reaktionskammern
- Konsistenzprüfung.

Der Gesamt-TQI ist der gewichtete Mittelwert der einzelnen Qualität Indices.

Diagramme:

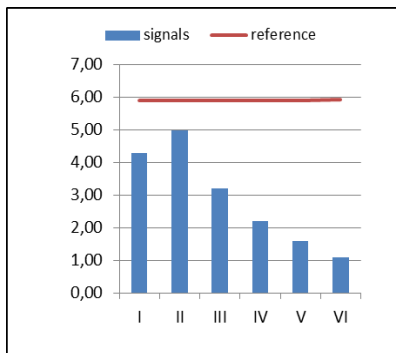


Diagramm „signals – reference“: Die Signalstärken von Reaktionskammer 1-6 nehmen im Idealfall mit steigender Lipidkonzentration ab und liegen alle unter dem Signal beider Referenzen. Bei Verbindungen, die sehr schwach an die Membran binden, liegen die Signale nur sehr knapp unterhalb derjenigen der Referenzen.

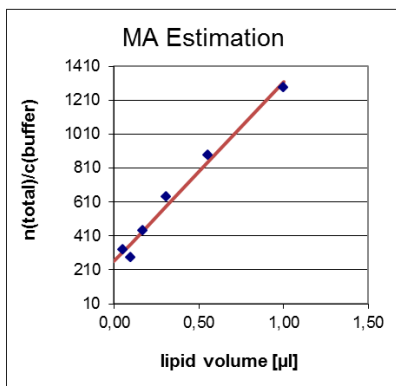


Diagramm „MA Estimation“: Das Verhältnis der Gesamtmenge an Testsubstanz zur Menge der Testsubstanz in der Pufferphase wird gegen die Konzentration an Lipidmembran dargestellt. Der y-Achsenschnittpunkt entspricht dem Gesamtvolumen an Puffer im Experiment und sollte demnach möglichst nah dem wahren Wert (240 µl) sein. Aus der Geraden lässt sich die Membranaffinität ablesen.

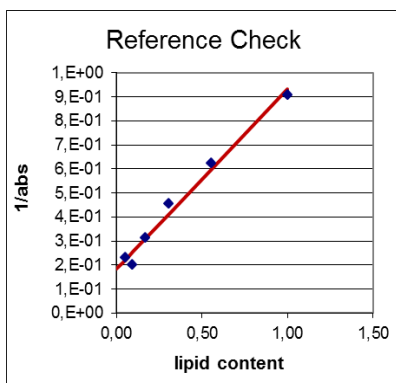


Diagramm „Reference check“: Wenn die Membranaffinität der Substanz in den Reaktionskammern mit jeweils unterschiedlichem Lipidgehalt bekannt ist, können durch lineare Regression die erwarteten Peakflächen der Referenzen ermittelt werden. Hierzu sind die Kehrwerte der Peakflächen der Konzentrationen in den Überständen der Reaktionsbehältnisse 1-6 gegen den

Lipidgehalt in den Reaktionsbehältnissen aufgetragen. Der Kehrwert des y-Achsenabschnittes entspricht der Peakfläche der Referenzen.

4.2.2 spezifische Werte für Microsomal Binding Kit

$f_u(\text{mic})$: freier Anteil = Anteil, der nicht an die Lebermikrosomen bindet;

$$f_u = \frac{n_b}{n_t} = \frac{c_b \times (V_t - V_l)}{n_t}$$

n_b ...	Menge an Testsubstanz in der Pufferphase
n_t ...	Gesamtmenge an Testsubstanz
c_b ...	Konzentration in der Pufferphase
V_t ...	Gesamtvolumen des Versuchsansatzes
V_l ...	Lipidvolumen des Versuchsansatzes

Wieviel von einem Wirkstoff an die Lebermikrosomen bindet, hat einen Einfluss auf die intrinsische Clearance: Cl_{inc} ist niedriger als die Clearance, die man erhält wenn keine Bindung an mikrosomale Membranen erfolgt.

$$Cl_{int} = \frac{Cl_{inc}}{f_u(\text{mic})}$$

Cl_{int} ...	Intrinsische Clearance
Cl_{inc} ...	Clearance bei Inkubation mit Lebermikrosomen
$f_u(\text{mic})$...	freier Anteil, der nicht an die Lebermikrosomen bindet

4.2.3 spezifische Werte für Intestinal Absorption Kit

$P_{int}[\text{cm/sec}]$: Permeabilitätskoeffizient

Wird aus der Membranaffinität und dem effektiven Molekulargewicht MW_{eff} der Verbindung errechnet. P_{int} hängt vom Volumen eines Moleküls ab, da dieses aber schwierig zu bestimmen ist, greift man auf das Molekulargewicht zurück. Halogene tragen weniger zum Volumen eines Moleküls bei als sie durch ihr Gewicht vorgeben, deshalb korrigiert man deren MG durch Subtraktion definierter Werte und erhält somit MW_{eff} .

$P_{int} : >10 [10^{-6} \text{ cm/sec}] \rightarrow \text{gute Resorption} (> 90\%)$

$<0,1 [10^{-6} \text{ cm/sec}] \rightarrow \text{schlechte Resorption}$

[pharmazeutische Zeitung 1999]

$K_d\text{HSA}$: Dissoziationskonstante bei der Bindung an HSA¹

$K_d\text{AGP}$: Dissoziationskonstante bei der Bindung an AGP¹

¹ Werte aus der Diplomarbeit von Sagaischek Katharina 2014 übernommen

f_u : freier Anteil = Anteil, der nicht an Plasmaproteine gebunden ist

$\log K^{B/F}$: Plasmaproteinbindungsindex. Gibt das Verhältnis des gebundenen Anteils zum freien Anteil der Substanz im Plasma an.

$VD [L/kg]$: Verteilungsvolumen

Aus den Ergebnissen zur Plasmaproteinbindung und Membranaffinität, kann das scheinbare Verteilungsvolumen eines Stoffes ausgerechnet werden.

$$VD = 10^{a \times \log(MA) + b \times \log(K_{b,f})} + c [L/kg]$$

a, b, c ... Parameter, die von den Ergebnissen der Transil Auswertung von 42 Wirkstoffen mit bekanntem VD erhalten wurden [User Guide Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit 2012]

4.3 Ergebnisse

4.3.1 Microsomal Binding Kit

Transil^{XL} Microsomal Binding Kit
Version 2 Revision 00

required input
optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	GHKU
Date:	21.01.2013
Assay volume LB:	240,0 µl
Lipid content:	1,00 µl
γ:	1,80

Quality Control Parameters		
Saturation Threshold	99,9%	compound bound
Outlier Threshold	1,5	standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98	r ²
Max difference of references:	30%	
MS saturation threshold	100000000	
model choice threshold	0,8	r ²

Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA _{mic}		r ²	TQI ¹	
		15,0 µl	80,0 µM					
No 1	SL5	15,0 µl	80,0 µM	2,63	± 0,52	1,0000		3,7
No 2	SL4	15,0 µl	80,0 µM	2,51	± 0,07	0,9954		8,2
No 3	SL3	15,0 µl	80,0 µM	3,26	± 0,08	0,9091		6,4
No 4	SL1*	15,0 µl	80,0 µM	-	-	-	-	-
No 5	SL2*	15,0 µl	80,0 µM	-	-	-	-	-
No 6	SL6*	15,0 µl	80,0 µM	-	-	-	-	-
No 7	SL7	15,0 µl	80,0 µM	2,84	± 0,07	0,9536		8,4
No 8	SL14	15,0 µl	80,0 µM	2,54	± 0,07	0,9932		7,7
No 9	SL8	15,0 µl	80,0 µM	3,09	± 0,15	0,9951		6,1
No 10	SL9	15,0 µl	80,0 µM	2,72	± 0,07	0,8773		7,7
No 11	SL10	15,0 µl	80,0 µM	3,03	± 0,08	0,9841		9,5
No 12	SL11*	15,0 µl	80,0 µM	-	-	-	-	-

ID	test article	fu mic (0,5 mg/ml)
1	SL5	88,9%
2	SL4	91,4%
3	SL3	65,4%
4	SL1*	-
5	SL2*	-
6	SL6*	-
7	SL7	83,4%
8	SL14	90,8%
9	SL8	73,8%
10	SL9	86,8%
11	SL10	76,5%
12	SL11*	-

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality
*aufgrund einer sehr niedrigen Membranaffinität (logMA kleiner als 2,5), Wiederholung des Tests mit Microsomal Low Binding Kit

Transil^{XL} Microsomal Binding Kit
Version 2 Revision 00

required input
optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	GHKU
Date:	21.01.2013
Assay volume LB:	240,0 µl
Lipid content:	1,00 µl
γ:	1,80

Quality Control Parameters		
Saturation Threshold	99,9%	compound bound
Outlier Threshold	1,5	standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98	r ²
Max difference of references:	30%	
MS saturation threshold	100000000	
model choice threshold	0,8	r ²

Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA _{mic}		r ²	TQI ¹	
		15,0 µl	80,0 µM					
No 13	SL12	15,0 µl	80,0 µM	3,14	± 0,05	0,9554	●	7,4
No 14	SL13	15,0 µl	80,0 µM	3,90	± 0,13	0,9989	●	7,4
No 15	Doxorubicin	15,0 µl	80,0 µM	2,63	± 0,01	0,9843	●	8,7

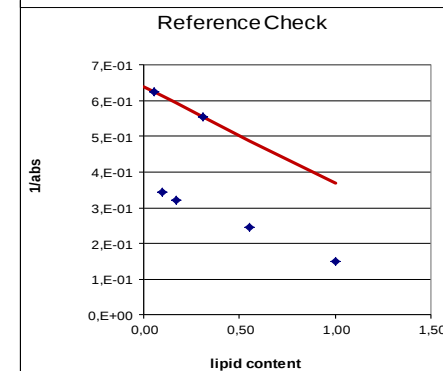
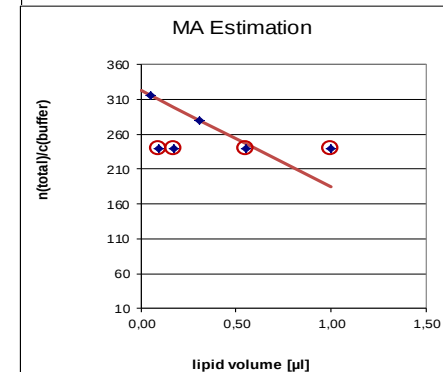
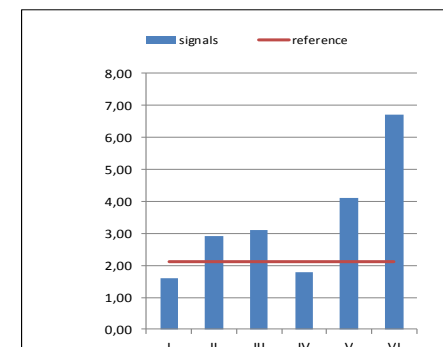
ID	test article	fu mic (0,5 mg/ml)
13	SL12	71,3%
14	SL13	30,2%
15	Doxorubicin	88.9%

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Model Parameters (fu _{mic})	
C _{lipid} /C _{protein}	0,581 µl/mg
V _{lipid}	0,29 µl
V _{total/assay}	1000,0 µl

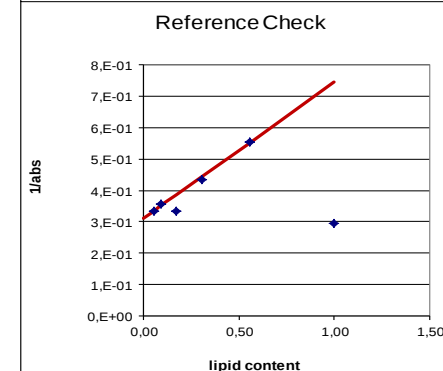
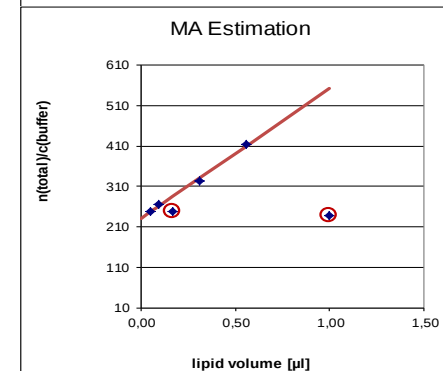
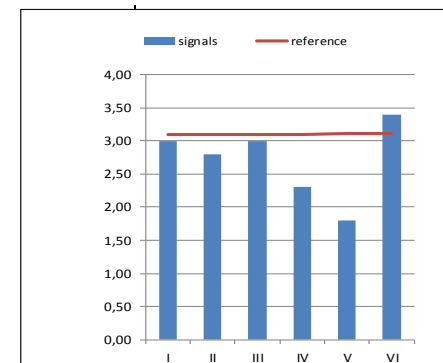
C_{microsomal protein} 0,5 mg/ml

test article No 1 SL5						
5,00 μ M 0 nm / amu						
Ref 1	2,20	A		av ref ok		
Ref 2	2,00	ref diff ok		max ref ok		
Signal Reference:	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	2,10	2,10	2,10	2,10	2,10	2,11
Signal in TRANSIL wells:	1,60	2,90	3,10	1,80	4,10	6,70
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	inconsistent	inconsistent	ok	inconsistent	inconsistent
saturation	ok	na	na	ok	na	ad data point
statistics	ok	type 2	type 2	ok	type 2	type 2
ok na na ok na na						
QC index: 3,7 logMA: 2,63 $\pm$ 0,52 r^2 : 1,00000						
warning messages: few valid data points, references exceed signal: solubility problem? data not consistent, slopes deviate from model assumption.						
consistency check						
signal < reference	2	1	0	1	0	0
binding > 0%	1	0	0	1	0	0
steady increase in binding & summary	2	1	0	1	0	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		6,25E-01	3,45E-01	3,23E-01	5,56E-01	2,44E-01
nt (nmol)		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		3,81	5,00	5,00	4,29	5,01
n(total)/c(buffer)		315	240	240	280	239
binding		24%	-38%	-48%	14%	-95%
Lipid concentration [ul/ml]		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [uM]		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	4	6	13
ecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1016	-1142	-1645	9871	-2665
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	0	0	1	0
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
tier due to saturation and consistency		1	0	0	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,053			0,309	
n(total)/c(buffer)		315,000			280,000	
slope		-136,86854				
intercept		322,24338				
r^2		1,0000				
prediction		315,000			280,000	
residuals		0,000			0,000	
standarized residuals		0,000			0,000	
Threshold		1,5				
statistical outlier	2	1	0	0	1	0
		0,053			0,309	
		315,000			280,000	
slope		-136,86854 < 1				
intercept		322,24338				
r^2		1,0000				
prediction	322,243	315,000	309,205	298,775	280,000	246,205
						185,375
outlier						
lipid content [ul]		0,095	0,171		0,556	1,000
n(total)/c(buffer)		239,905	239,829		239,444	239,000
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,76	1,38	1,48	0,86	1,95
compound bound		0,24	-0,38	-0,48	0,14	-0,95
valid log lipid		-1,276			-0,511	
valid compound bound		0,238			0,143	
slope		-0,12436				
intercept		0,07937				
r^2		1,0000				



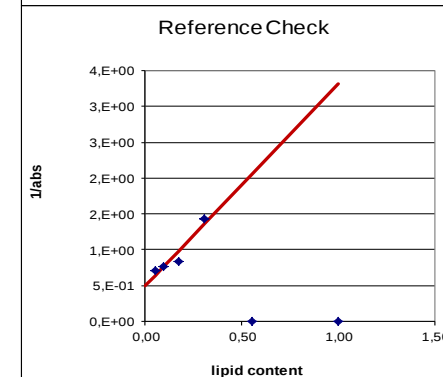
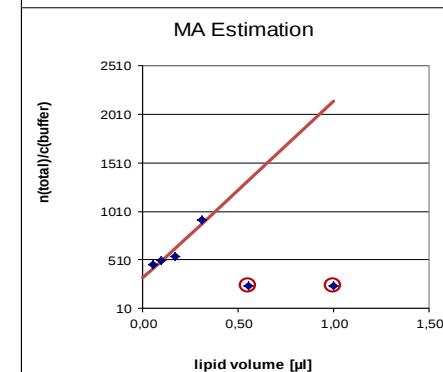
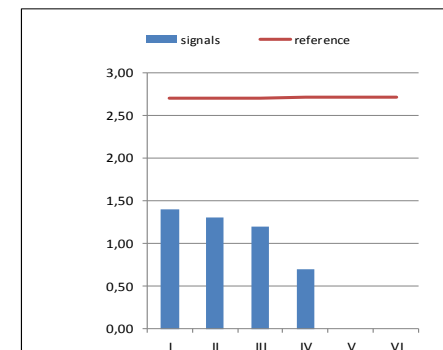
reg	< 1 $\pm$ 0,52	1,00000
avg	2,63 $\pm$ 0,52	0
choice	2,63E+00 $\pm$ 0,52	

test article No 2 SL4						
5,00 μM 0 nm / amu						
Ref 1	3,10	M	av ref too low			
Ref 2	2,50	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10	3,10
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	3,10	3,10	3,10	3,10	3,11	3,11
Signal in TRANSIL wells:	3,00	2,80	3,00	2,30	1,80	3,40
						ok
-						
missing values						
	1	1	1	1	1	1
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	inconsistent
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	na
statistics	ok	ok	outlier	ok	ok	na
QC index: 8,2 logMA: 2,51 $\pm$ 0,07 r^2 : 0,99544						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	5	1	1	1	1	0
binding > 0%		1	1	1	1	0
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	1	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		3,33E-01	3,57E-01	3,33E-01	4,35E-01	5,56E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		4,84	4,52	4,84	3,71	2,90
n(total)/c(buffer)		248	266	248	323	413
binding		3%	10%	3%	26%	42%
Lipid concentration [μM]		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [μM]		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	4	5	7
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		7495	4497	24285	5464	6053
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	0
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [μl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		248,000	265,714	248,000	323,478	413,333
slope		337,36208				
intercept		219,82814				
r^2		0,9393				
prediction		237,682	251,965	277,675	323,952	407,252
residuals		10,318	13,749	-29,675	-0,474	6,082
standardized residuals		0,592	0,789	0,000	0,000	0,349
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	1	0	1	0
		0,053	0,095		0,309	0,556
		248,000	265,714		323,478	413,333
slope		322,18007	2,51			
intercept		231,08934				
r^2		0,9954				
prediction	231,089	248,140	261,780	286,333	330,528	410,078
						553,269
outlier						
lipid content [μl]			0,171			1,000
n(total)/c(buffer)			248,000			239,000
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,97	0,90	0,97	0,74	0,58
compound bound		0,03	0,10	0,03	0,26	0,42
valid log lipid		-1,276	-1,021		-0,511	-0,255
valid compound bound		0,032	0,097		0,258	0,419
slope		0,36646				
intercept		0,48226				
r^2		0,9695				



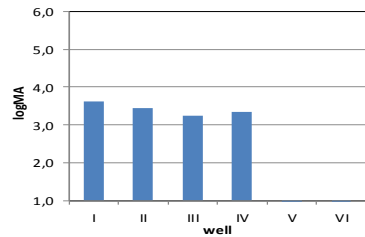
reg	2,51 $\pm$ 0,07	0,99544
avg	2,38 $\pm$ 0,07	1
choice	2,51E+00 $\pm$ 0,07	

test article No 3 SL3						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	2,70	M	av ref ok			
Ref 2	1,40	high ref diff	max ref ok			
Signal Reference:	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70	2,70
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	2,70	2,70	2,70	2,70	2,71	2,71
Signal in TRANSIL wells:	1,40	1,30	1,20	0,70 na	na	ok
Ref 1 <> Ref 2						
missing values						
	1	1	1	0	0	
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	inconsistent	inconsistent
saturation	ok	ok	ok	ok	na	na
statistics	ok	ok	ok	ok	na	na
QC index: 6,4 logMA: 3,26 ± 0,08 r ² : 0,90911						
warning messages: references exceed signal: solubility problem? data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	4	1	1	1	0	0
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	4	1	1	1	0	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,56	1,00
1/signal in TRANSIL well		7,14E-01	7,69E-01	8,33E-01	1,43E+00	na
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		2,59	2,41	2,22	1,30	5,01
n(total)/c(buffer)		463	498	540	926	239
binding		48%	52%	56%	74%	0%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [µM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	1	2	13	23
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		502	839	1410	1904	3045808967
saturation threshold		99,9%				5482456140
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	0	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,053	0,095	0,171	0,309	
n(total)/c(buffer)		462,857	498,462	540,000	925,714	
slope		1824,75451				
intercept		320,13869				
r ²		0,9091				
prediction		416,709	493,965	633,025	883,335	
residuals		46,149	4,497	-93,025	42,380	
standardized residuals		0,712	0,069	0,000	0,654	
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	1	1	1	0
		0,053	0,095	0,171	0,309	
		462,857	498,462	540,000	925,714	
slope		1824,75451	3,26			
intercept		320,13869				
r ²		0,9091				
prediction	320,139	416,709	493,965	633,025	883,335	1333,891
outlier						
lipid content [µl]					0,556	1,000
n(total)/c(buffer)					239,444	239,000
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	0,00
compound free		0,52	0,48	0,44	0,26	1,00
compound bound		0,48	0,52	0,56	0,74	0,00
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	
valid compound bound		0,481	0,519	0,556	0,741	
slope		0,31919				
intercept		0,85926				
r ²		0,8345				

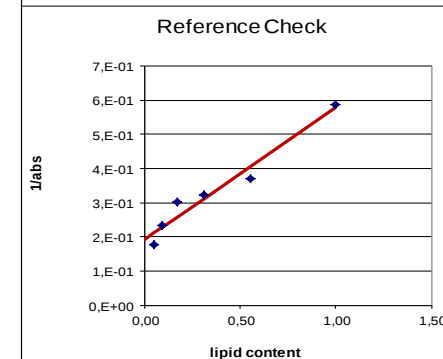
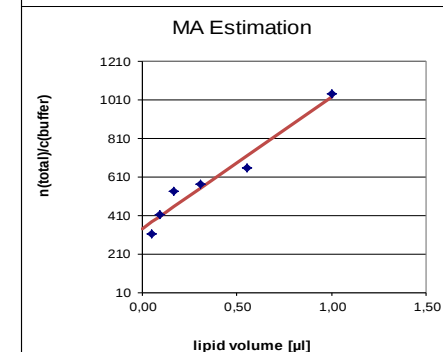
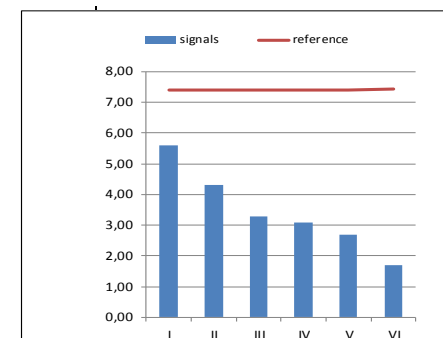


reg	3,26 ± 0,08	0,90911
avg	3,41 ± 0,08	1
choice	3,26E+00 ± 0,08	

lipid content	0	0,05	reference QC	0,10	0,17	0,31	0,56	1,00	
1/signal in TRANSIL well		7,14E-01	7,69E-01	8,33E-01	1,43E+00	-	-	-	
valid lipid content		0,05	0,10	0,17	0,31				
valid 1/signal		7,14E-01	7,69E-01	8,33E-01	1,43E+00				
slope		2,81598							
intercept		0,49404							
r ²		0,9091							
predicted 1/signal	0	1	1	1	1	2	3		
Predicted Reference Value		2,02							
Actual Reference Value		2,70							
Relative deviation		25,0%							
QC index: 6,4 no. data points 6 reference 10,0% 8 20,0% r² MA predictic 0,9999 7 0,999 ref. Treatment A 8 M ref > signal 6 6 5 consistency 3 warning messages data points reference ref. Treatment ref > signal consistency data not cc r² MA prediction slopes intercept summary references exceed signal: solubility problem? dat									
mean x		0,157		n	4				
(x _i -mean(x)) ²		0,01	0,00	0,00	0,02				
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,04							
residuals		46,149	4,497	-93,025	42,380				
s ²		1064,8432	10,1114	4326,8498	898,0221				
studentized residual		0,85	0,07	-1,36	1,41				
		0,85	0,07	1,36	1,41				
		1	1	1	1	0	0		
slope		0,053	0,095	0,171	0,309				
intercept		462,857	498,462	540,000	925,714				
r ²		1824,75451	#BEZUG!						
		320,13869							
		0,9091							
mean x		0,157		n	4				
(x _i -mean(x)) ²		0,01	0,00	0,00	0,02				
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,04							
residuals		46,149	4,497	-93,025	42,380				
s ²		1064,8432	10,1114	4326,8498	898,0221				
studentized residual		0,85	0,07	-1,36	1,41				
		0,85	0,07	1,36	1,41				
		1	1	1	1	0	0		
slope		0,053	0,095	0,171	0,309				
intercept		462,857	498,462	540,000	925,714				
r ²		1824,75451	3,26						
		320,13869							
		0,9091							
Standard Error		1	1	1	1	0	0		
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200	1,200	V	VI		
V_lipid [μl]		0,053	0,095	0,171	0,309				
V_buffer [μl]		239,947	239,905	239,829	239,691				
c_buffer		2,593	2,408	2,224	1,298				
c_lipid [μM]		10917,504	6531,840	3888,000	2880,000				
logMA		3,6	3,4	3,2	3,3				
mean		3,4							
SE(logMA)		0,08							
max		3,6							
min		3,2							
logMA		3,6	3,4	3,2	3,3				



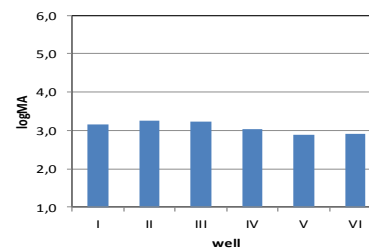
test article No 7 SL7						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	7,40	M	av ref ok			
Ref 2	4,00	high ref diff	max ref ok			
Signal Reference:	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40	7,40
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	7,40	7,40	7,41	7,41	7,42	7,43
Signal in TRANSIL wells:	5,60	4,30	3,30	3,10	2,70	1,70
Ref 1 <> Ref 2						
missing values						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok
QC index: 8,4 logMA: 2,84 ± 0,07 r ² : 0,95360						
warning messages:						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		1,79E-01	2,33E-01	3,03E-01	3,23E-01	3,70E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		3,78	2,91	2,23	2,09	1,82
n(total)/c(buffer)		317	413	538	573	658
binding		24%	42%	55%	58%	64%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [µM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	1	2	3	5
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		994	1039	1414	2427	3996
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		317,143	413,023	538,182	572,903	657,778
slope		685,11572				
intercept		341,25778				
r ²		0,9536				
prediction		377,516	406,522	458,733	552,713	721,878
residuals		-60,373	6,501	79,449	20,190	-64,100
standardized residuals		0,000	0,119	1,458	0,370	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
		317,143	413,023	538,182	572,903	657,778
		685,11572	2,84			
		341,25778				
		0,9536				
prediction	341,258	377,516	406,522	458,733	552,713	721,878
outlier						
lipid content [µl]						
n(total)/c(buffer)						
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,76	0,58	0,45	0,42	0,36
compound bound		0,24	0,42	0,55	0,58	0,64
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	-0,255
valid compound bound		0,243	0,419	0,554	0,581	0,635
slope		0,37056				
intercept		0,77027				
r ²		0,9408				



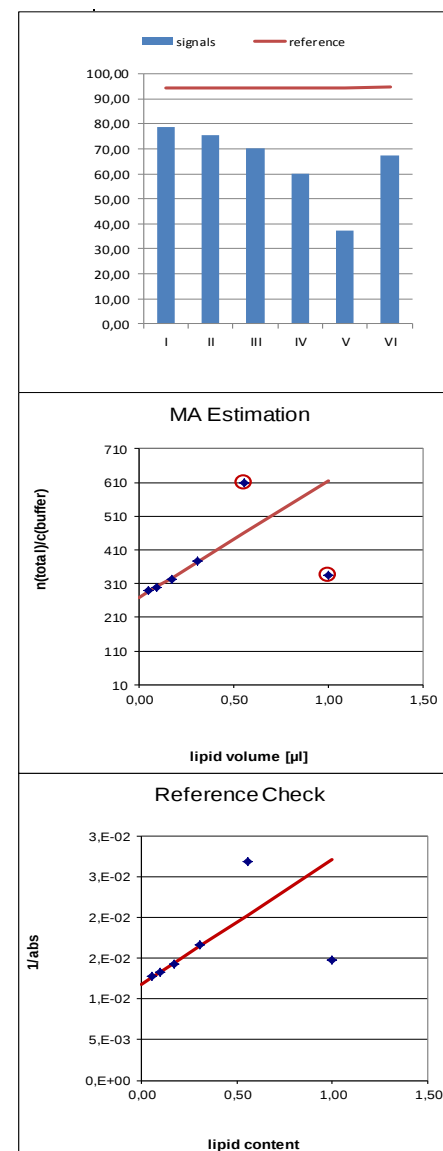
reg	2,84 ± 0,07	0,95360
avg	3,08 ± 0,07	1
choice	2,84E+00 ± 0,07	

reference QC											
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56	1,00				
1/signal in TRANSIL well		1,79E-01	2,33E-01	3,03E-01	3,23E-01	3,70E-01	5,88E-01				
valid lipid content		0,05	0,10	0,17	0,31	0,56	1,00				
valid 1/signal		1,79E-01	2,33E-01	3,03E-01	3,23E-01	3,70E-01	5,88E-01				
slope		0,38576									
intercept		0,19215									
r ²		0,9536									
predicted 1/signal	0	0	0	0	0	0	1				
Predicted Reference Value		5,20									
Actual Reference Value		7,40									
Relative deviation		29,7%									
QC index: 8,4											
no. data points	10	reference	8	r ² MA predictic	7	ref. Treatment	8	ef > signal	10	consistency	10
		10,0%		0,9999		A		6	10	6	10
6	10	20,0%		0,999		M	8	5		5	
5		50,0%	8	0,99		R		4		4	
4		100,0%	7	0,9	7	slopes	10	5		3	
3		200,0%	5	0,8	6	1/abs > 0	5	2		2	
2		500,0%	3	0,7	5	:mp bound > 0	5	1		1	
1		<500%		0,6	4	id)/c(buffer) >0	10	0			
0				0,5	3					1,42	5
				<0,5							
warning messages											
data points											
reference											
ref. Treatment											
ref > signal											
consistency											
r ² MA prediction											
slopes											
intercept											
summary											
1. step outlier detection											
mean x		0,364		n	6						
(x _i -mean(x)) ²		0,10	0,07	0,04	0,00	0,04	0,40				
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,65									
		0,68	0,72	0,78	0,83	0,78	0,21				
residuals		-60,373	6,501	79,449	20,190	-64,100	18,332				
		2970,3488									
		911,2163	10,5672	1578,0270	101,9088	1027,1977	84,0190				
s ²		3712,9360									
studentized residual		-1,20	0,13	1,48	0,36	-1,19	0,65				
		1,20	0,13	1,48	0,36	1,19	0,65				
		1	1	1	1	1	1				
		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556	1,000				
slope		317,143	413,023	538,182	572,903	657,778	1044,706				
intercept		685,11572	#BEZUG!								
r ²		341,25778									
		0,9536									
2. step outlier detection											
mean x		0,364		n	6						
(x _i -mean(x)) ²		0,10	0,07	0,04	0,00	0,04	0,40				
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,65									
		0,68	0,72	0,78	0,83	0,78	0,21				
residuals		-60,373	6,501	79,449	20,190	-64,100	18,332				
		911,2163	10,5672	1578,0270	101,9088	1027,1977	84,0190				
s ²		3712,9360									
studentized residual		-1,20	0,13	1,48	0,36	-1,19	0,65				
		1,20	0,13	1,48	0,36	1,19	0,65				
		1	1	1	1	1	1				
		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556	1,000				
slope		317,143	413,023	538,182	572,903	657,778	1044,706				
intercept		685,11572	2,84								
r ²		341,25778									
		0,9536									
Standard Error											
		1	1	1	1	1	1				
		I	II	III	IV	V	VI				
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200				
V _{lipid} [μl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556	1,000				
V _{buffer} [μl]		239,947	239,905	239,829	239,691	239,444	239,000				
c _{buffer}		3,785	2,907	2,231	2,097	1,829	1,153				
c _{lipid} [μM]		5515,496	5277,172	3877,492	2259,243	1371,892	924,324				
logMA		3,2	3,3	3,2	3,0	2,9	2,9				
mean		3,1									
SE(logMA)		0,07									
max		3,3									
min		2,9									
logMA		3,2	3,3	3,2	3,0	2,9	2,9				

well	logMA
I	3,2
II	3,3
III	3,2
IV	3,0
V	2,9
VI	2,9

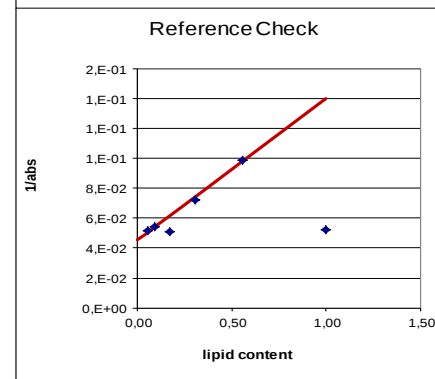
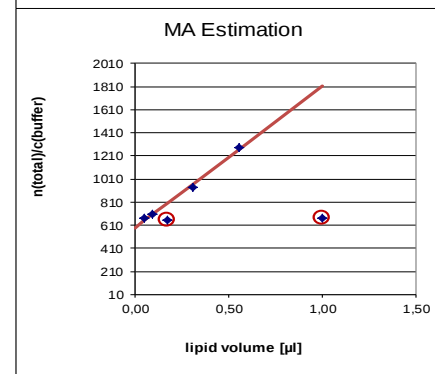
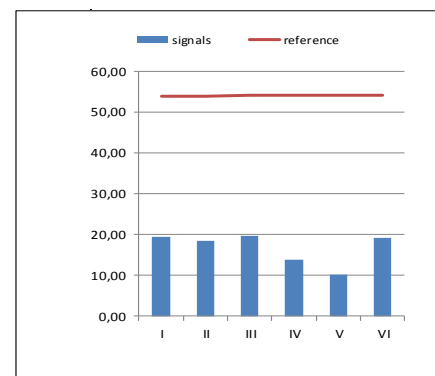


test article No 8 SL14						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	102,30	A	av ref ok			
Ref 2	86,20	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	94,25	94,25	94,25	94,25	94,25	94,25
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	94,27	94,29	94,32	94,37	94,47	94,64
Signal in TRANSIL wells:	78,50	75,40	70,20	60,10	37,10	67,40
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	inconsistent
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	na
statistics	ok	ok	ok	ok	outlier	na
QC index: 7,7 logMA: 2,54 ± 0,07 r²: 0,99322						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	1	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	1,00
1/signal in TRANSIL well		1,27E-02	1,33E-02	1,42E-02	1,66E-02	2,70E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		4,16	4,00	3,72	3,19	1,97
n(total)/c(buffer)		288	300	322	376	610
binding		17%	20%	26%	36%	61%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [µM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	3	4	5
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1447	2176	3070	3892	4186
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well		1	1	1	1	0
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		288,153	300,000	322,222	376,373	609,704
slope		636,49686				
intercept		228,58724				
r²		0,9415				
prediction		262,272	289,220	337,726	425,037	582,197
residuals		25,881	10,780	-15,504	-48,664	27,507
standarized residuals		0,803	0,335	0,000	0,000	0,854
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	1	1	0	0
		0,053	0,095	0,171	0,309	
		288,153	300,000	322,222	376,373	
slope		346,89533	2,54			
intercept		267,19908				
r²		0,9932				
prediction	267,199	285,558	300,244	326,680	374,266	459,919
outlier						
lipid content [µl]					0,556	1,000
n(total)/c(buffer)					609,704	335,608
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,83	0,80	0,74	0,64	0,39
compound bound		0,17	0,20	0,26	0,36	0,61
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	
valid compound bound		0,167	0,200	0,255	0,362	
slope		0,25104				
intercept		0,47045				
r²		0,9352				

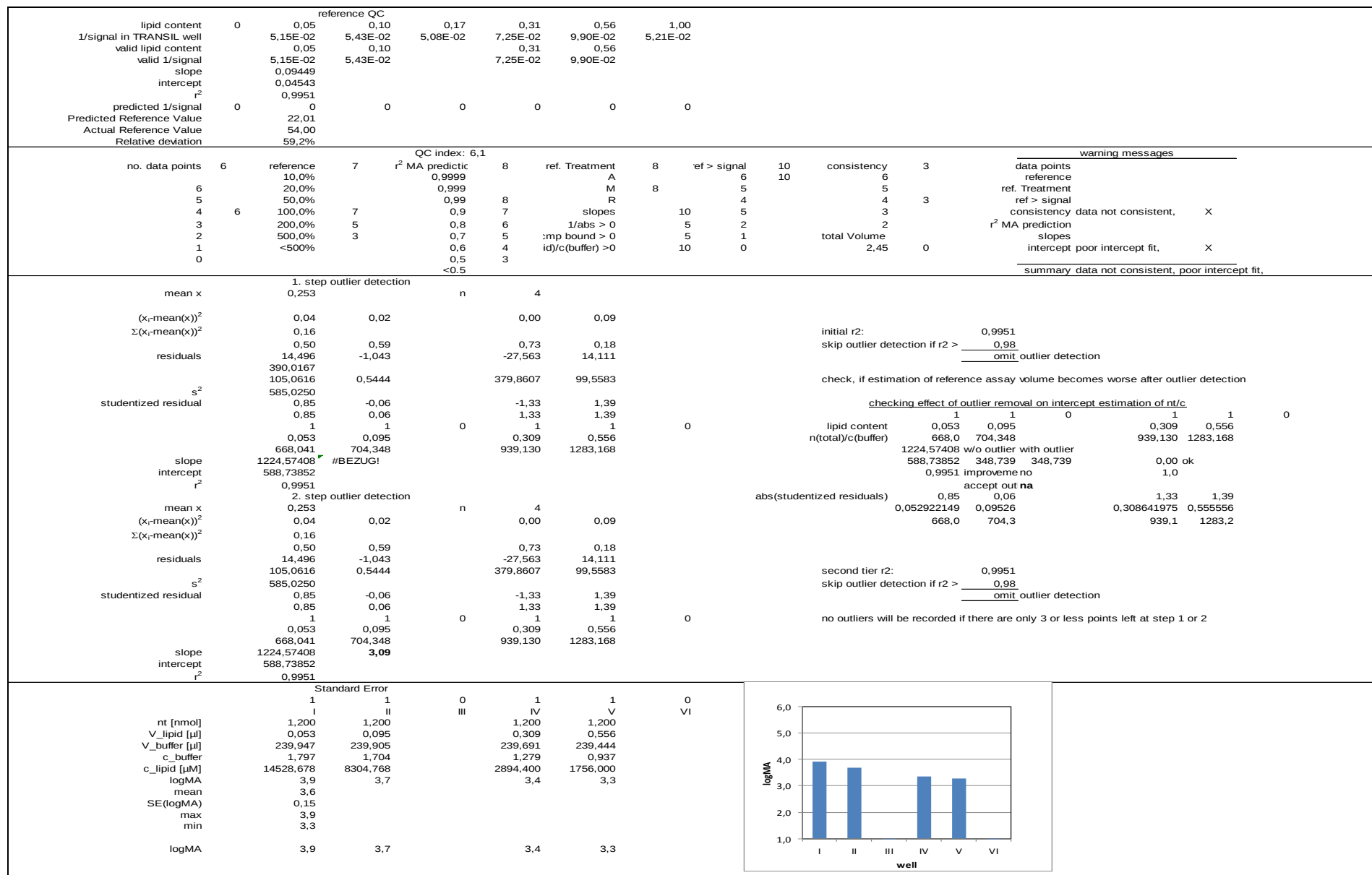


reg	2,54 ± 0,07	0,99322
avg	2,77 ± 0,07	1
choice	2,54E+00 ± 0,07	

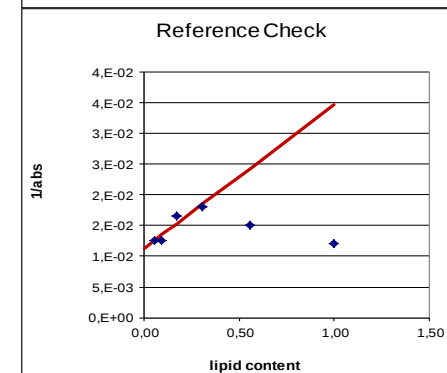
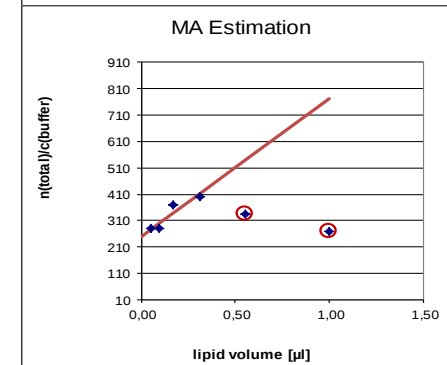
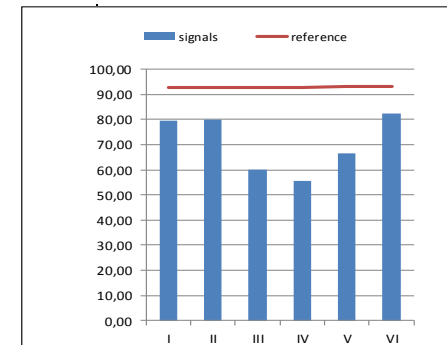
test article No 9 SL8						
5,00 μM0 nm / amu Ref 135,90M av ref ok Ref 254,00high ref diff max ref ok Signal Reference:54,0054,0054,0054,0054,0054,00 TRANSIL well:I II III IV V VI adjusted reference:54,0154,0254,0454,0754,1354,23 Signal in TRANSIL wells:19,4018,4019,7013,8010,1019,20 Ref 1 <> Ref 2 missing values outlier detection consistencyok ok inconsistent ok ok inconsistent saturationok ok na ok ok na statisticsok ok na ok ok na QC index: 6,1logMA: 3,09 $\pm$ 0,15r^2: 0,99513 warning messages: data not consistent, poor intercept fit,						
consistency check signal < reference611111 binding > 0%111111 steady increase in binding & summary4110110 removal of outliers due to saturation lipid content00,050,100,310,561,00 1/signal in TRANSIL well5,15E-025,43E-025,08E-027,25E-029,90E-025,21E-02 nt [nmol]1,21,21,21,21,2 c(buffer)* [μmol/l]1,801,701,821,280,941,78 n(total)/c(buffer)6687046589391283675 binding64%66%64%74%81%64% Lipid concentration [μl/ml]:0,220,400,711,292,314,17 Lipid concentration [μM]:290522940169230465482 Molecular ratio lipid:total cmp242122 Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)3776601233189431227089 saturation threshold99,9% systematic outlier (saturation)111111 consistent saturation111111 bead level saturation (mol_ratio < 40)111111 valid lipid conc. valid c(lipid)/c(buffer) in well outlier due to saturation and consistency110110 statistical outlier detection & removal lipid content [μl]0,0530,0950,3090,556 n(total)/c(buffer)668,041704,348939,1301283,168 slope1224,57408 intercept588,73852 $r^2$0,9951 prediction653,546705,391966,6931269,057 residuals14,496-1,043-27,56314,111 standardized residuals0,7340,0000,0000,715 Threshold1,5 statistical outlier411010 0,0530,0950,3090,556 668,041704,348939,1301283,168 slope1224,57408 intercept588,73852 $r^2$0,9951 prediction588,739653,546705,391798,713966,6931269,0571813,313 outlier lipid content [μl]0,1711,000 n(total)/c(buffer)657,868675,000 binding QC log lipid-1,28-1,02-0,77-0,51-0,260,00 compound free0,360,340,360,260,190,36 compound bound0,640,660,640,740,810,64 valid log lipid-1,276-1,021-0,511-0,255 valid compound bound0,6410,6590,7440,813 slope0,16830 intercept0,84324 $r^2$0,9672						



reg	3,09 $\pm$ 0,15	0,99513
avg	3,56 $\pm$ 0,15	1
choice	3,09E+00 $\pm$ 0,15	

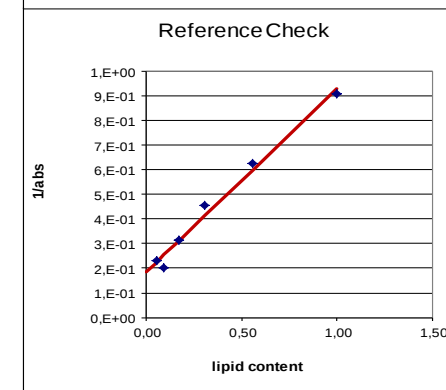
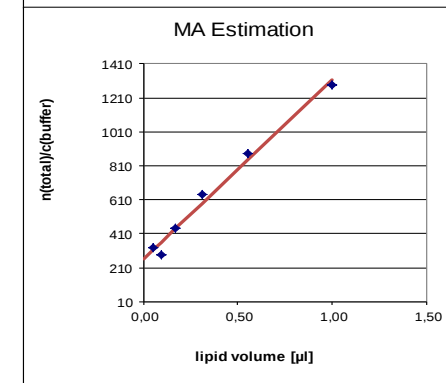
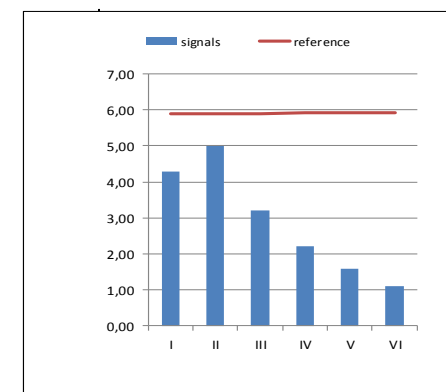


test article No 10 SL9						
5,00 μM 0 nm / amu						
Ref 1	92,90	A	av ref ok			
Ref 2	92,50	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	92,70	92,70	92,70	92,70	92,70	92,70
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	92,72	92,74	92,77	92,82	92,92	93,09
Signal in TRANSIL wells:	79,30	79,80	60,20	55,40	66,50	82,30
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	inconsistent	inconsistent
saturation	ok	ok	ok	ok	na	na
statistics	ok	ok	ok	ok	na	na
QC index: 7,7 logMA: 2,72 $\pm$ 0,07 r^2 : 0,87729						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	4	1	1	1	0	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		1,26E-02	1,25E-02	1,66E-02	1,81E-02	1,50E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		4,28	4,30	3,25	2,99	3,59
n(total)/c(buffer)		281	279	370	402	335
binding		14%	14%	35%	40%	28%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [uM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	3	4	9
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1673	3127	2234	3504	8980
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	0	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,053	0,095	0,171	0,309	
n(total)/c(buffer)		280,555	278,797	369,568	401,588	
slope		521,41744				
intercept		250,72653				
r^2		0,8773				
prediction		278,321	300,397	340,133	411,658	
residuals		2,234	-21,600	29,435	-10,069	
standardized residuals		0,102	0,000	1,344	0,000	
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	1	1	1	0
		0,053	0,095	0,171	0,309	
		280,555	278,797	369,568	401,588	
slope		521,41744	2,72			
intercept		250,72653				
r^2		0,8773				
prediction	250,727	278,321	300,397	340,133	411,658	540,403
outlier						
lipid content [ul]					0,556	1,000
n(total)/c(buffer)					334,556	270,328
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,86	0,86	0,65	0,60	0,72
compound bound		0,14	0,14	0,35	0,40	0,28
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	
valid compound bound		0,145	0,139	0,351	0,402	
slope		0,38582				
intercept		0,60388				
r^2		0,8599				



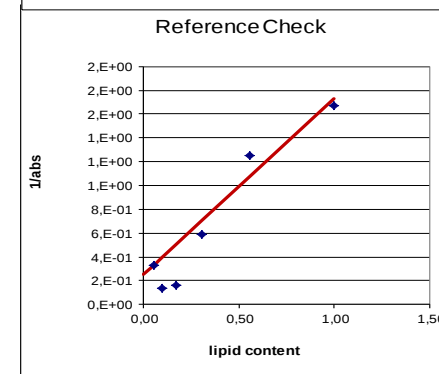
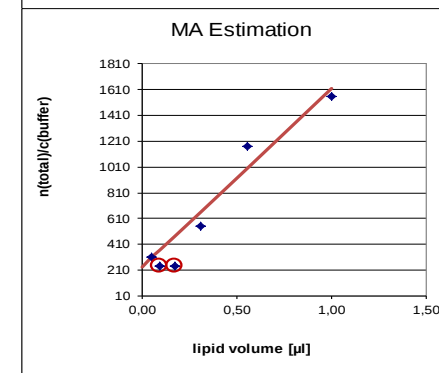
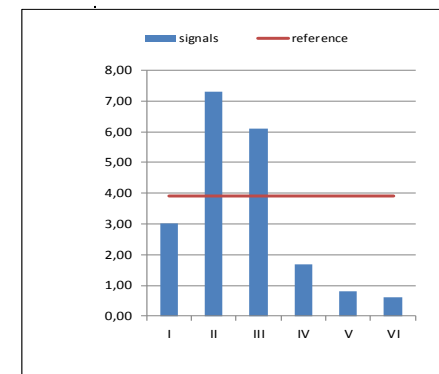
reg	2,72 $\pm$ 0,07	0,87729
avg	2,77 $\pm$ 0,07	1
choice	2,72E+00 $\pm$ 0,07	

test article No 11 SL10						
		5,00 μ M				0 nm / amu
Ref 1		6,40	A	av ref ok		
Ref 2		5,40	ref diff ok	max ref ok		
Signal Reference:		5,90	5,90	5,90	5,90	5,90
TRANSIL well:		I	II	III	IV	V
adjusted reference:		5,90	5,90	5,90	5,91	5,91
Signal in TRANSIL wells:		4,30	5,00	3,20	2,20	1,60
						ok
		-				
		missing values				
		1	1	1	1	1
		outlier detection				
consistency		ok	ok	ok	ok	ok
saturation		ok	ok	ok	ok	ok
statistics		ok	ok	ok	ok	ok
						0,0
QC index:	9,5	logMA:	3,03 $\pm$ 0,08	r^2 : 0,98411		
warning messages:						
		consistency check				
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
		removal of outliers due to saturation				
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		2,33E-01	2,00E-01	3,13E-01	4,55E-01	6,25E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		3,64	4,24	2,71	1,86	1,36
n(total)/c(buffer)		329	283	443	644	885
binding		27%	15%	46%	63%	73%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [uM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	2	3	4
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		892	2853	1712	2249	3483
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
		statistical outlier detection & removal				
lipid content [ul]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		329,302	283,200	442,500	643,636	885,000
slope		1059,42585				
intercept		259,54785				
r^2		0,9841				
prediction		315,615	360,469	441,205	586,531	848,118
residuals		13,687	-77,269	1,295	57,105	36,882
standarized residuals		0,282	0,000	0,027	1,176	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
		329,302	283,200	442,500	643,636	885,000
		1059,42585	3,03			
		259,54785				
		0,9841				
prediction	259,548	315,615	360,469	441,205	586,531	848,118
		outlier				
lipid content [ul]						
n(total)/c(buffer)						
		binding QC				
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,73	0,85	0,54	0,37	0,27
compound bound		0,27	0,15	0,46	0,63	0,73
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	-0,255
valid compound bound		0,271	0,153	0,458	0,627	0,729
slope		0,51599				
intercept		0,83777				
r^2		0,8897				



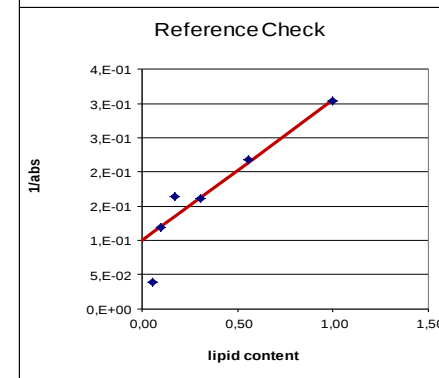
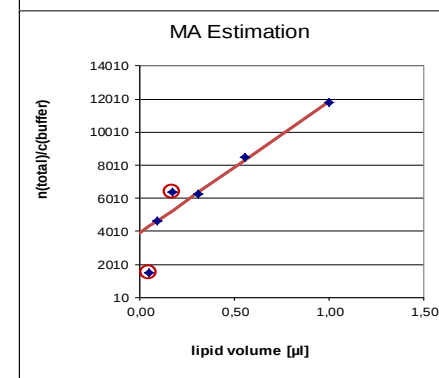
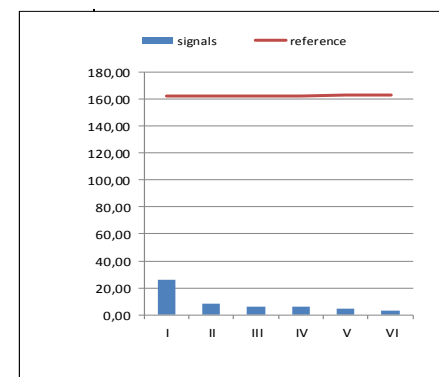
reg	3,03 $\pm$ 0,08	0,98411
avg	3,03 $\pm$ 0,08	1
choice	3,03E+00 $\pm$ 0,08	

test article No 13 SL12						
5,00 μ M 0 nm / amu						
Ref 1	4,40	A	av ref ok			
Ref 2	3,40	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90	3,90
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	3,90	3,90	3,90	3,91	3,91	3,92
Signal in TRANSIL wells:	3,00	7,30	6,10	1,70	0,80	0,60
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	inconsistent	inconsistent	ok	ok	ok
saturation	ok	na	na	ok	ok	ad data point
statistics	ok	type 2	type 2	ok	ok	na
0,0						
QC index: 7,4 logMA: 3,14 $\pm$ 0,05 r^2 : 0,95541						
warning messages: references exceed signal: solubility problem? data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	4	1	0	1	1	1
binding > 0%		1	0	0	1	1
steady increase in binding & summary	4	1	0	0	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		3,33E-01	1,37E-01	1,64E-01	5,88E-01	1,25E+00
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		3,85	5,00	5,00	2,18	1,03
n(total)/c(buffer)		312	240	240	551	1170
binding		23%	-87%	-56%	56%	79%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [uM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	4	3	3
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1048	-499	-1389	2500	3193
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	0	0	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	0	0	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,053		0,309	0,556	1,000
n(total)/c(buffer)		312,000		550,588	1170,000	1560,000
slope		1382,73923				
intercept		235,42791				
r^2		0,9554				
prediction		308,605		662,199	1003,616	1618,167
residuals		3,395		-111,611	166,384	-58,167
standardized residuals		0,028		0,000	1,381	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	0	0	1	1
outlier		0,053		0,309	0,556	1,000
		312,000		550,588	1170,000	1560,000
slope		1382,73923	3,14			
intercept		235,42791				
r^2		0,9554				
prediction	235,428	308,605	367,147	472,523	662,199	1003,616
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,77	1,87	1,56	0,44	0,21
compound bound		0,23	-0,87	-0,56	0,56	0,79
valid log lipid		-1,276			-0,511	-0,255
valid compound bound		0,231			0,564	0,795
slope		0,50223				
intercept		0,86538				
r^2		0,9756				



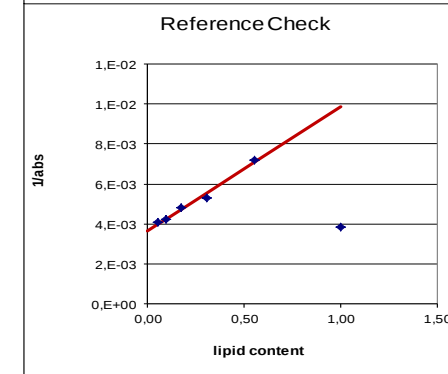
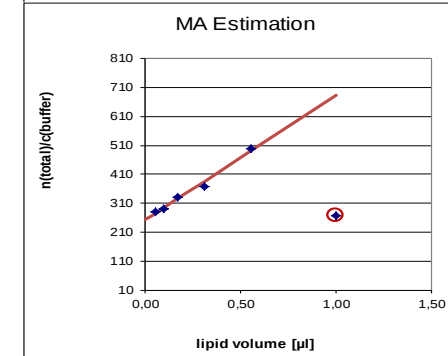
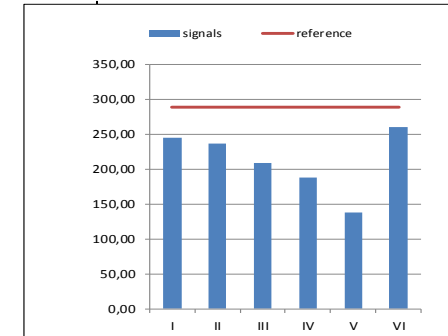
reg	3,14 $\pm$ 0,05	0,95541
avg	3,12 $\pm$ 0,05	1
choice	3,14E+00 $\pm$ 0,05	

test article No 14 SL13						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	160,70	A	av ref ok			
Ref 2	164,00	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	162,35	162,35	162,35	162,35	162,35	162,35
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	162,39	162,41	162,47	162,56	162,73	163,03
Signal in TRANSIL wells:	25,80	8,40	6,10	6,20	4,60	3,30
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	outlier	ok	outlier	ok	ok	ok
0,0						
QC index: 7,4 logMA: 3,90 ± 0,13 r ² : 0,99895						
warning messages: poor intercept fit,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		3,88E-02	1,19E-01	1,64E-01	1,61E-01	2,17E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		0,79	0,26	0,19	0,19	0,14
n(total)/c(buffer)		1510	4639	6388	6285	8470
binding		84%	95%	96%	96%	97%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [µM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	0	0	0	0
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		287	459	814	1466	2612
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		1510,233	4638,571	6387,541	6284,516	8470,435
slope		8978,59900				
intercept		3248,44655				
r ²		0,8670				
prediction		3723,613	4103,747	4787,987	6019,619	8236,557
residuals		-2213,381	534,825	1599,554	264,897	233,878
standardized residuals		0,000	0,422	1,261	0,209	0,184
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	0	1	0	1	1
			0,095	0,309	0,556	1,000
			4638,571	6284,516	8470,435	11807,273
slope		7968,18445	3,90			
intercept		3896,86927				
r ²		0,9989				
prediction	3896,869	4318,563	4655,917	5263,156	6356,185	8323,638
						11865,054
outlier						
lipid content [µl]		0,053	0,171			
n(total)/c(buffer)		1510,233	6387,541			
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,16	0,05	0,04	0,04	0,03
compound bound		0,84	0,95	0,96	0,96	0,97
valid log lipid			-1,021		-0,511	-0,255
valid compound bound			0,948		0,962	0,972
slope		0,03095				
intercept		0,97918				
r ²		0,9940				



reg	3,90 ± 0,13	0,99895
avg	4,30 ± 0,13	
choice	3,90E+00 ± 0,13	1

test article No 15 Doxorubicin						
	5,00 µM		0 nm / amu			
Ref 1	275,40	A	av ref ok			
Ref 2	301,50	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	288,45	288,45	288,45	288,45	288,45	288,45
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	288,51	288,56	288,66	288,82	289,12	289,66
Signal in TRANSIL wells:	245,10	237,30	208,50	188,60	138,60	260,00
	ok					
	missing values					
	1	1	1	1	1	1
	outlier detection					
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	inconsistent
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	na
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	na
QC index: 8,7 logMA: 2,63 ± 0,05 r ² : 0,98433						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	1	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,10	0,17	0,31	0,56
1/signal in TRANSIL well		4,08E-03	4,21E-03	4,80E-03	5,30E-03	7,22E-03
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		4,25	4,11	3,61	3,27	2,40
n(total)/c(buffer)		282	292	332	367	499
binding		15%	18%	28%	35%	52%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,22	0,40	0,71	1,29	2,31
Lipid concentration [µM]:		290	522	940	1692	3046
Molecular ratio lipid:total cmp		242	2	3	5	6
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1609	2454	2826	4074	4886
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well		1	1	1	1	1
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
n(total)/c(buffer)		282,448	291,732	332,029	367,063	499,481
slope		428,90110				
intercept		252,99968				
r ²		0,9843				
prediction		275,698	293,857	326,542	385,377	491,278
residuals		6,750	-2,125	5,486	-18,314	8,202
standardized residuals		0,614	0,000	0,499	0,000	0,747
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	1	1	1	1	0
		0,053	0,095	0,171	0,309	0,556
		282,448	291,732	332,029	367,063	499,481
slope		428,90110	2,63			
intercept		252,99968				
r ²		0,9843				
prediction	253,000	275,698	293,857	326,542	385,377	491,278
		681,901				
outlier						
lipid content [µl]						1,000
n(total)/c(buffer)						266,262
binding QC						
log lipid		-1,28	-1,02	-0,77	-0,51	-0,26
compound free		0,85	0,82	0,72	0,65	0,48
compound bound		0,15	0,18	0,28	0,35	0,52
valid log lipid		-1,276	-1,021	-0,766	-0,511	-0,255
valid compound bound		0,150	0,177	0,277	0,346	0,520
slope		0,35541				
intercept		0,56627				
r ²		0,9341				



reg	2,63 ± 0,05	0,98433
avg	2,73 ± 0,05	1
choice	2,63E+00 ± 0,05	

4.3.2 Microsomal Binding Kit – low affinity compounds

Transil^{XL} Microsomal Low Binding Kit

Version 2 Revision 00

required input
optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	CMRY
Date:	08.08.2013
Assay volume LB:	240,0 µl
Lipid content:	2,00 µl
γ:	1,80

Quality Control Parameters		
Saturation Threshold	99,9%	compound bound
Outlier Threshold	1,5	standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98	r ²
Max difference of references:	30%	
MS saturation threshold	100000000	
model choice threshold	0,8	r ²

Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA _{mic}		r ²	TQI ¹	
		15,0 µl	80,0 µM					
No 4	SL1	15,0 µl	80,0 µM	2,58	± 0,04	0,9966	●	4,9
No 5	SL2	15,0 µl	80,0 µM	2,13	± 0,08	0,9909	●	8,7
No 6	SL6	15,0 µl	80,0 µM	2,81	± 0,03	0,9990	●	8,9
No 12	SL11	15,0 µl	80,0 µM	2,29	± 0,06	0,9988	●	8,6

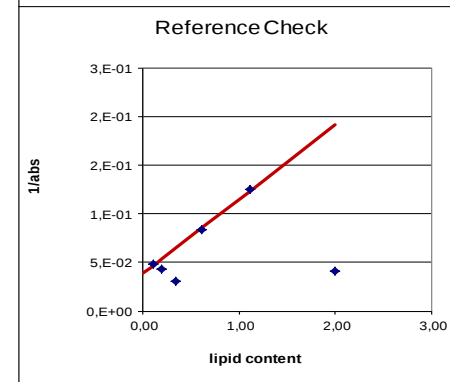
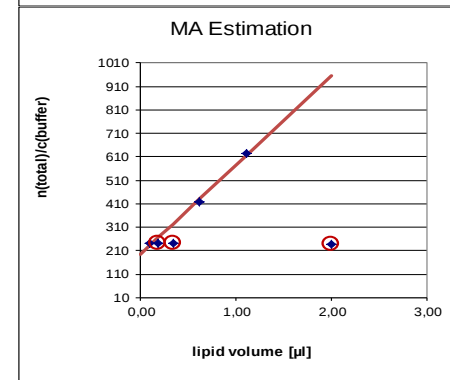
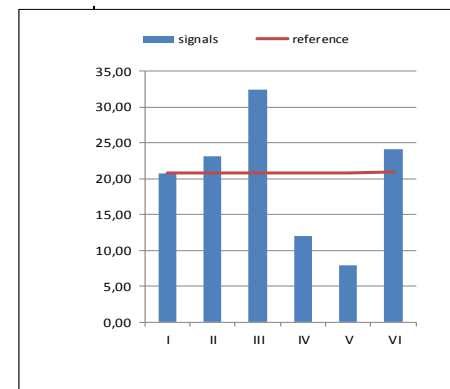
ID	test article	fu mic (0,5 mg/ml)
No 4	SL1	90,0%
No 5	SL2	96,3%
No 6	SL6	84,4%
No 12	SL11	94,7%

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Model Parameters (fu _{mic})	
C _{lipid} /C _{protein}	0,581 µl/mg
V _{lipid}	0,29 µl
V _{total/assay}	1000,0 µl

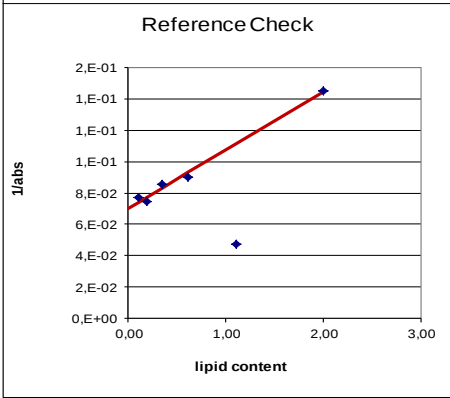
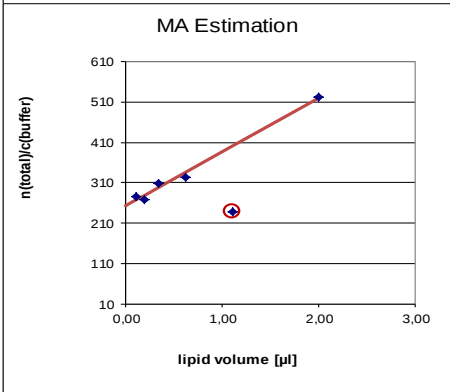
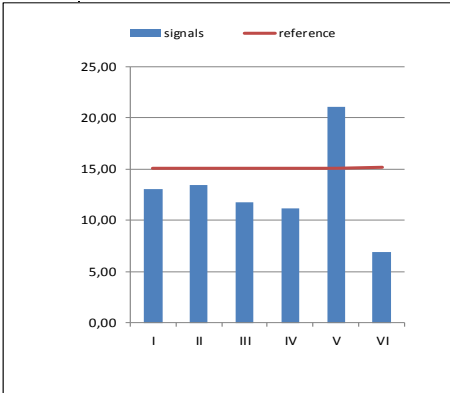
C _{microsomal protein}	0,5 mg/ml
---------------------------------	-----------

test article No 4 SL1						
	5,00 μ M	0 nm / amu				
Ref 1	19,60	R	av ref too low			
Ref 2	19,40	ref diff ok	max ref too low			
Signal Reference:	20,80	20,80	20,80	20,80	20,80	20,80
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	20,81	20,82	20,83	20,85	20,90	20,97
Signal in TRANSIL wells:	20,80	23,10	32,40	12,00	8,00	24,10
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	inconsistent	inconsistent	ok	ok	inconsistent
saturation	reference	na	na	ok	ok	ad data point
statistics	reference	type 2	type 2	ok	ok	type 2
	ok	na	na	ok	ok	na
QC index: 4,9 logMA: 2,58 $\pm$ 0,04 r^2 : 0,99662						
warning messages: few valid data points, poor reference quality: solubility problem? references exceed signal: solubility problem? data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	3	1	0	0	1	0
binding > 0%		1	0	0	1	0
steady increase in binding & summary	3	1	0	0	1	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	0,62	1,11
1/signal in TRANSIL well		4,81E-02	4,33E-02	3,09E-02	8,33E-02	1,25E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [μmol/l]		5,00	5,00	5,01	2,88	1,92
n(total)/c(buffer)		240	240	240	416	624
binding		0%	-11%	-56%	42%	-16%
Lipid concentration [μl/ml]:		0,44	0,79	1,43	2,57	4,63
Lipid concentration [μM]:		580	1045	1880	3384	6092
Molecular ratio lipid:total cmp		484	4	8	8	10
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		580286726	-7872	-2809	6666	8249
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	0	0	1	0
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	0	0	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [μl]		0,106			0,617	1,111
n(total)/c(buffer)		240,000			416,000	624,000
slope		381,76318				
intercept		193,25165				
r^2		0,9966				
prediction		233,659			428,908	617,433
residuals		6,341			-12,908	6,567
standardized residuals		0,567			0,000	0,587
Threshold		1,5				
statistical outlier	3	1	0	0	1	0
		0,106			0,617	1,111
		240,000			416,000	624,000
slope		381,76318	2,58			
intercept		193,25165				
r^2		0,9966				
prediction	193,252	233,659	265,985	324,172	428,908	617,433
						956,778
outlier						
lipid content [μl]		0,191	0,343			2,000
n(total)/c(buffer)		239,809	239,657			238,000
binding QC						
log lipid		-0,98	-0,72	-0,46	-0,21	0,05
compound free		1,00	1,11	1,56	0,58	0,38
compound bound		0,00	-0,11	-0,56	0,42	0,62
valid log lipid		-0,975			-0,210	0,046
valid compound bound		0,000			0,423	0,615
slope		0,59108				
intercept		0,57059				
r^2		0,9954				



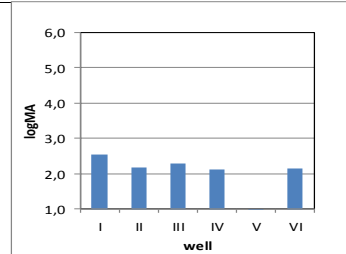
reg	2,58 $\pm$ 0,04	0,99662
avg	2,50 $\pm$ 0,04	1
choice	2,58E+00 $\pm$ 0,04	

test article No 5 SL2						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	14,00	A	av ref ok			
Ref 2	16,00	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00	15,00
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	15,01	15,01	15,02	15,04	15,07	15,13
Signal in TRANSIL wells:	13,00	13,40	11,70	11,10	21,00	6,90
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	inconsistent	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	na	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	type 2	ok
0,0						
QC index: 8,7 logMA: 2,13 ± 0,08 r²: 0,99086						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	5	1	1	1	0	1
binding > 0%	1	1	1	1	0	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	0	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	0,62	1,11
1/signal in TRANSIL well		7,69E-02	7,46E-02	8,55E-02	9,01E-02	4,76E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		4,33	4,47	3,90	3,70	5,02
n(total)/c(buffer)		277	269	308	324	239
binding		13%	11%	22%	26%	-40%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,44	0,79	1,43	2,57	4,63
Lipid concentration [µM]:		580	1045	1880	3384	6092
Molecular ratio lipid:total cmp		484	4	6	10	25
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		3627	8160	7122	10847	-12691
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	0
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	0	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,106	0,191	0,343	0,617	2,000
n(total)/c(buffer)		276,923	268,657	307,692	324,324	521,739
slope		133,14484				
intercept		253,14765				
r²		0,9909				
prediction		267,240	278,514	298,808	335,336	519,437
residuals		9,683	-9,858	8,885	-11,012	2,302
standarized residuals		0,973	0,000	0,892	0,000	0,231
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	1	1	1	0	1
lipid content [µl]		0,106	0,191	0,343	0,617	2,000
n(total)/c(buffer)		276,923	268,657	307,692	324,324	521,739
slope		133,14484	2,13			
intercept		253,14765				
r²		0,9909				
prediction	253,148	267,240	278,514	298,808	335,336	401,086
outlier						
lipid content [µl]					1,111	
n(total)/c(buffer)					238,889	
binding QC						
log lipid		-0,98	-0,72	-0,46	-0,21	0,05
compound free		0,87	0,89	0,78	0,74	1,40
compound bound		0,13	0,11	0,22	0,26	-0,40
valid log lipid		-0,975	-0,720	-0,465	-0,210	0,301
valid compound bound		0,133	0,107	0,220	0,260	0,540
slope		0,33210				
intercept		0,38940				
r²		0,8921				

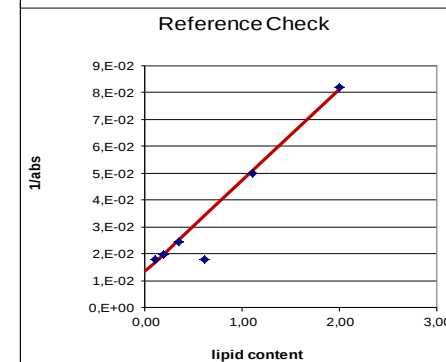
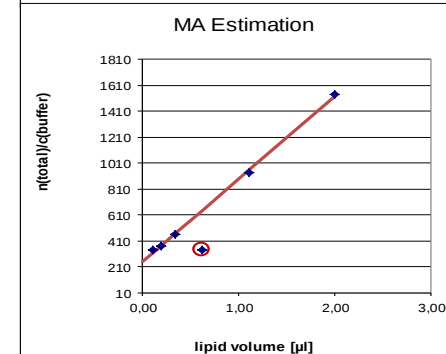
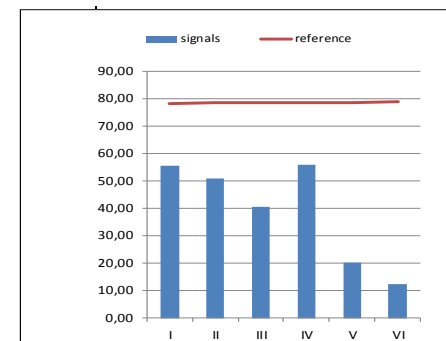


reg	2,13 ± 0,08	0,99086
avg	2,26 ± 0,08	1
choice	2,13E+00 ± 0,08	

reference QC											
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	0,62	1,11	2,00				
1/signal in TRANSIL well		7,69E-02	7,46E-02	8,55E-02	9,01E-02	4,76E-02	1,45E-01				
valid lipid content		0,11	0,19	0,34	0,62		2,00				
valid 1/signal		7,69E-02	7,46E-02	8,55E-02	9,01E-02		1,45E-01				
slope		0,03698									
intercept		0,07032									
r ²		0,9909									
predicted 1/signal	0	0	0	0	0	0	0				
Predicted Reference Value		14,22									
Actual Reference Value		15,00									
Relative deviation		5,2%									
QC index: 8,7											
no. data points	9	reference	10	r ² MA predictic	8	ref. Treatment	10	ef > signal	8	consistency	6
		10,0%	10	0,9999		A	10	6		6	warning messages
6		20,0%	9	0,999		M		5	8	5	data points
5	9	50,0%	8	0,99	8	R		4		4	reference
4		100,0%	7	0,9	7	slopes	10	5	4	3	ref > signal
3		200,0%	5	0,8	6	1/abs > 0	5	2		2	consistency data not cc
2		500,0%	3	0,7	5	comp bound > 0	5	1		1	r ² MA prediction
1		<500%		0,6	4	id)/c(buffer) >0	10	0		0	slopes
0				0,5	3						intercept
				<0,5						1,05	10
summary data not consistent,											
1. step outlier detection											
mean x		0,651		n	5						
(x _i -mean(x)) ²		0,30	0,21	0,10	0,00			1,82			
Σ(x _i -mean(x)) ²		2,43									
residuals		0,68	0,71	0,76	0,80			0,05			
		9,683	-9,858	8,885	-11,012			2,302			
s ²		99,1042									
		31,2522	32,3911	26,3118	40,4177			1,7661			
studentized residual		1,02	-1,02	0,89	-1,07			0,90			
		1,02	1,02	0,89	1,07			0,90			
		1	1	1	1	0		1			
		0,106	0,191	0,343	0,617			2,000			
		276,923	268,657	307,692	324,324			521,739			
slope		133,14484	#BEZUG!								
intercept		253,14765									
r ²		0,9909									
2. step outlier detection											
mean x		0,651		n	5						
(x _i -mean(x)) ²		0,30	0,21	0,10	0,00			1,82			
Σ(x _i -mean(x)) ²		2,43									
residuals		0,68	0,71	0,76	0,80			0,05			
		9,683	-9,858	8,885	-11,012			2,302			
s ²		31,2522	32,3911	26,3118	40,4177			1,7661			
studentized residual		1,02	-1,02	0,89	-1,07			0,90			
		1,02	1,02	0,89	1,07			0,90			
		1	1	1	1	0		1			
		0,106	0,191	0,343	0,617			2,000			
		276,923	268,657	307,692	324,324			521,739			
slope		133,14484	2,13								
intercept		253,14765									
r ²		0,9909									
Standard Error											
		I	II	III	IV	V	VI				
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200	1,200		1,200				
V_lipid [µl]		0,106	0,191	0,343	0,617		2,000				
V_buffer [µl]		239,894	239,809	239,657	239,383		238,000				
c_buffer		4,335	4,470	3,906	3,710		2,319				
c_lipid [µM]		1511,654	671,846	769,824	505,440		324,000				
logMA		2,5	2,2	2,3	2,1		2,1				
mean		2,3									
SE(logMA)		0,08									
max		2,5									
min		2,1									
logMA		2,5	2,2	2,3	2,1		2,1				



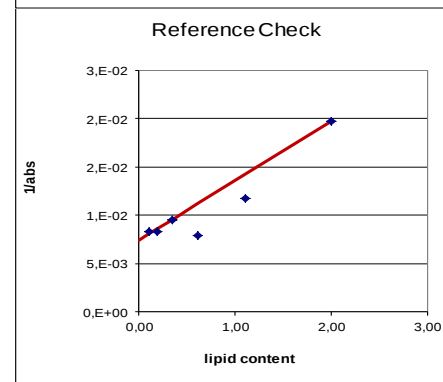
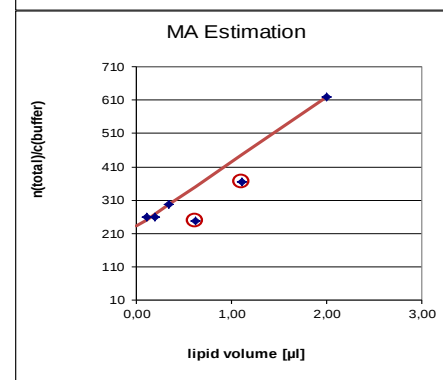
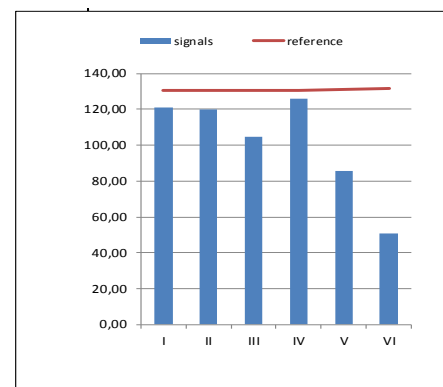
test article No 6 SL6							
		5,00 μ M		0 nm / amu			
Ref 1	69,00	A		av ref ok			
Ref 2	87,40	ref diff ok		max ref ok			
Signal Reference:	78,20	78,20	78,20	78,20	78,20	78,20	
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI	
adjusted reference:	78,23	78,26	78,31	78,40	78,56	78,86	
Signal in TRANSIL wells:	55,30	50,90	40,60	55,70	20,00	12,20	ok
missing values							
1 1 1 1 1 1							
outlier detection							
consistency	ok	ok	ok	inconsistent	ok	ok	
saturation	ok	ok	ok	na	ok	ok	
statistics	ok	ok	ok	na	ok	ok	
0,0							
QC index: 8,9 logMA: 2,81 $\pm$ 0,03 r^2 : 0,99896							
warning messages: data not consistent,							
consistency check							
signal < reference	6	1	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	0	1	1
removal of outliers due to saturation							
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	0,62	1,11	2,00
1/signal in TRANSIL well		1,81E-02	1,96E-02	2,46E-02	1,80E-02	5,00E-02	8,20E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		3,54	3,25	2,60	3,56	1,28	0,78
n(total)/c(buffer)		339	369	462	337	938	1538
binding		29%	35%	48%	29%	74%	84%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,44	0,79	1,43	2,57	4,63	8,33
Lipid concentration [uM]:		580	1045	1880	3384	6092	10965
Molecular ratio lipid:total cmp		484	3	4	10	6	7
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1651	2493	3259	9802	6821	10826
saturation threshold		99,9%					
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1	1
valid lipid conc.							
valid c(lipid)/c(buffer) in well							
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	0	1	1
statistical outlier detection & removal							
lipid content [ul]		0,106	0,191	0,343		1,111	2,000
n(total)/c(buffer)		339,385	368,723	462,266		938,400	1538,361
slope		637,30877					
intercept		251,39304					
r^2		0,9990					
prediction		318,849	372,813	469,949		959,514	1526,011
residuals		20,537	-4,090	-7,683		-21,114	12,350
standardized residuals		1,241	0,000	0,000		0,000	0,746
Threshold		1,5					
statistical outlier	5	1	1	1	0	1	1
		0,106	0,191	0,343		1,111	2,000
		339,385	368,723	462,266		938,400	1538,361
slope		637,30877	2,81				
intercept		251,39304					
r^2		0,9990					
prediction	251,393	318,849	372,813	469,949	644,794	959,514	1526,011
outlier							
lipid content [ul]				0,617			
n(total)/c(buffer)				336,948			
binding QC							
log lipid		-0,98	-0,72	-0,46	-0,21	0,05	0,30
compound free		0,71	0,65	0,52	0,71	0,26	0,16
compound bound		0,29	0,35	0,48	0,29	0,74	0,84
valid log lipid		-0,975	-0,720	-0,465		0,046	0,301
valid compound bound		0,293	0,349	0,481		0,744	0,844
slope		0,45580					
intercept		0,70751					
r^2		0,9903					



reg	2,81 $\pm$ 0,03	0,99896
avg	2,84 $\pm$ 0,03	1
choice	2,81E+00 $\pm$ 0,03	

reference QC										
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	0,62	1,11	2,00			
1/signal in TRANSIL well		1,81E-02	1,96E-02	2,46E-02	1,80E-02	5,00E-02	8,20E-02			
valid lipid content		0,11	0,19	0,34		1,11	2,00			
valid 1/signal		1,81E-02	1,96E-02	2,46E-02		5,00E-02	8,20E-02			
slope		0,03396								
intercept		0,01339								
r ²		0,9990								
predicted 1/signal	0	0	0	0	0	0	0			
Predicted Reference Value		74,66								
Actual Reference Value		78,20								
Relative deviation		4,5%								
QC index: 8,9										
no. data points	9	reference	10	r ² MA	predictic	8	ref. Treatment	10	ef > signal	10
		10,0%	10		0,9999		A	10		10
6		20,0%	9		0,999		M		6	6
5	9	50,0%	8		0,99	8	R		5	6
4		100,0%	7		0,9	7	slopes	10	5	4
3		200,0%	5		0,8	6	1/abs > 0	5	2	3
2		500,0%	3		0,7	5	:mp bound > 0	5	1	2
1		<500%			0,6	4	id)/c(buffer) > 0	10	0	total Volume
0					0,5	3				1,05
					<0,5					10
warning messages										
data points										
reference										
ref. Treatment										
ref > signal										
consistency data not cc										
r ² MA prediction										
slopes										
intercept										
summary data not consistent,										
1. step outlier detection										
mean x		0,750		n		5				
(x _i -mean(x)) ²		0,42	0,31	0,17			0,13	1,56		
Σ(x _i -mean(x)) ²		2,59								
residuals		0,64	0,68	0,74			0,75	0,20		
		20,537	-4,090	-7,683			-21,114	12,350		
		273,9570								
		140,5844	5,5759	19,6754			148,5989	50,8414		
s ²		365,2760								
studentized residual		1,34	-0,26	-0,47			-1,28	1,46		
		1,34	0,26	0,47			1,28	1,46		
		1	1	1		0	1	1		
		0,106	0,191	0,343			1,111	2,000		
slope		339,385	368,723	462,266			938,400	1538,361		
intercept		637,30877	#BEZUG!							
r ²		251,39304								
		0,9990								
2. step outlier detection										
mean x		0,750		n		5				
(x _i -mean(x)) ²		0,42	0,31	0,17			0,13	1,56		
Σ(x _i -mean(x)) ²		2,59								
residuals		0,64	0,68	0,74			0,75	0,20		
		20,537	-4,090	-7,683			-21,114	12,350		
		140,5844	5,5759	19,6754			148,5989	50,8414		
s ²		365,2760								
studentized residual		1,34	-0,26	-0,47			-1,28	1,46		
		1,34	0,26	0,47			1,28	1,46		
		1	1	1		0	1	1		
		0,106	0,191	0,343			1,111	2,000		
slope		339,385	368,723	462,266			938,400	1538,361		
intercept		637,30877	2,81							
r ²		251,39304								
		0,9990								
Standard Error										
		I	II	III	IV	V	VI			
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200		1,200	1,200			
V_lipid [μl]		0,106	0,191	0,343		1,111	2,000			
V_buffer [μl]		239,894	239,809	239,657		238,889	238,000			
c_buffer		3,537	3,257	2,600		1,285	0,787			
c_lipid [μM]		3320,034	2198,858	1682,480		803,785	506,394			
logMA		3,0	2,8	2,8		2,8	2,8			
mean		2,8								
SE(logMA)		0,03								
max		3,0								
min		2,8								
logMA		3,0	2,8	2,8		2,8	2,8			

test article No 12 SL11						
5,00 μ M 0 nm / amu						
Ref 1	132,30	A	av ref ok			
Ref 2	128,50	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	130,40	130,40	130,40	130,40	130,40	130,40
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	130,46	130,50	130,59	130,74	131,01	131,50
Signal in TRANSIL wells:	120,90	120,20	104,80	126,00	85,50	50,60
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	inconsistent	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	na	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	na	outlier	ok
QC index: 8,6 logMA: 2,29 $\pm$ 0,06 r^2 : 0,99877						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	0	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,11	0,19	0,34	1,11	2,00
1/signal in TRANSIL well		8,27E-03	8,32E-03	9,54E-03	7,94E-03	1,17E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		4,64	4,61	4,02	4,83	3,28
n(total)/c(buffer)		259	260	299	248	366
binding		7%	8%	20%	3%	34%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,44	0,79	1,43	2,57	4,63
Lipid concentration [uM]:		580	1045	1880	3384	6092
Molecular ratio lipid:total cmp		484	4	6	14	17
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		6638	11128	7981	83580	14743
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	0	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,106	0,191	0,343	1,111	2,000
n(total)/c(buffer)		258,859	260,366	298,626	366,035	618,498
slope		182,16449				
intercept		223,83840				
r^2		0,9455				
prediction		243,119	258,544	286,309	426,243	588,167
residuals		15,739	1,822	12,317	-60,208	30,331
standardized residuals		0,448	0,052	0,350	0,000	0,862
Threshold		1,5				
statistical outlier	4	1	1	1	0	1
		0,106	0,191	0,343		2,000
		258,859	260,366	298,626		618,498
slope		193,37544	2,29			
intercept		231,49322				
r^2		0,9988				
prediction	231,493	251,961	268,335	297,809	350,861	446,355
outlier						
lipid content [ul]				0,617	1,111	
n(total)/c(buffer)				248,381	366,035	
binding QC						
log lipid		-0,98	-0,72	-0,46	-0,21	0,05
compound free		0,93	0,92	0,80	0,97	0,39
compound bound		0,07	0,08	0,20	0,03	0,34
valid log lipid		-0,975	-0,720	-0,465		0,301
valid compound bound		0,073	0,078	0,196		0,612
slope		0,45105				
intercept		0,44948				
r^2		0,9549				



reg	2,29 $\pm$ 0,06	0,99877
avg	2,20 $\pm$ 0,06	1
choice	2,29E+00 $\pm$ 0,06	

[illegible]

4.3.3 Intestinal Absorption Kit

Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit
Version 2.00

required input
optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	DJLN
Date:	12.12.2012
Assay volume IA:	240,0 µl
Lipid content:	0,90 µl
γ:	1,80

Quality Control Parameters		
Saturation Threshold	99,9%	compound bound
Outlier Threshold	1,5	standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98	r ²
Max difference of references:	30%	
MS saturation threshold	100000000	
model choice threshold	0,8	r ²

Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA		r ²	TQI ¹
		15,0 µl	80,0 µM				
No 1	SL5	15,0 µl	80,0 µM	2,64	± 0,12	0,9189	● 7,4
No 2	SL4	15,0 µl	80,0 µM	3,24	± 0,07	0,9747	● 7,3
No 3	SL3	15,0 µl	80,0 µM	3,15	± 0,27	0,9452	● 6,5
No 4	SL1	15,0 µl	80,0 µM	2,52	± 0,09	0,9779	● 7,0
No 5	SL2	15,0 µl	80,0 µM	2,22	± 0,14	0,8934	● 8,3
No 6	SL6	15,0 µl	80,0 µM	2,83	± 0,05	0,9924	● 9,6
No 7	SL7	15,0 µl	80,0 µM	2,54	-	0,9546	● 9,5
No 8	SL14	15,0 µl	80,0 µM	2,87	± 0,03	0,9947	● 8,6
No 9	SL8	15,0 µl	80,0 µM	2,65	± 0,08	0,9854	● 9,3
No 10	SL9	15,0 µl	80,0 µM	2,84	± 0,07	0,9702	● 9,5
No 11	SL10	15,0 µl	80,0 µM	3,03	± 0,03	0,9929	● 9,7
No 12	SL11	15,0 µl	80,0 µM	2,23	± 0,15	0,9970	● 9,6

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Model Parameters		
1. Vss		
logMA	A	0,5255
logK ^{B/F}	B	-0,3403
constant	const	-0,8425
2. Pint		
	A	7440
	B	1,0E+07
	C	2,5E-07
	D	202
	α	0,6
	β	4,395
	γ	16
Plasma Parameters		
Physiological HSA conc.		5,88E-04
Physiological AGP conc.		2,00E-05

Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit

Version 2.00

required input

optional input

Intestinal Permeability Coefficient								
Please enter the molecular weight and number of halogen atoms of the parent molecule (without counterions)								
Compound name		MW parent molecule; without counterion	Number of atoms				MW _{eff}	Predicted P _{int} [cm/sec]
			Fluorine	Chlorine	Bromine	Iodine		
No 1	SL5	268,00					268	1,90E-05
No 2	SL4	359,00					359	1,69E-05
No 3	SL3	395,00					395	1,37E-05
No 4	SL1	240,00					240	2,10E-05
No 5	SL2	242,00					242	1,66E-05
No 6	SL6	282,00					282	1,95E-05
No 7	SL7	404,00					404	6,26E-06
No 8	SL14	418,00					418	9,12E-06
No 9	SL8	376,00					376	9,17E-06
No 10	SL9	420,00					420	8,63E-06
No 11	SL10	382,00					382	1,32E-05
No 12	SL11	395,00					395	3,96E-06

Volume of Distribution				
plasma protein binding data e.g. from TRANSIL HSA and AGP Binding experiments				Predicted VD [L/kg]
K _D ^{HSA} [mol/L]	K _D ^{AGP} [mol/L]	free fraction f _u	logK ^{B/F}	
	1,40E-03	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
9,10E-06	1,40E-03	1,5%	1,81	1,74770
6,57E-05	2,51E-05	9,3%	0,99	3,00273
		n/a	n/a	n/a
4,11E-05	7,51E-05	6,4%	1,16	0,84897
3,55E-05	1,60E-04	5,7%	1,22	1,69921
3,65E-05	1,20E-06	3,0%	1,52	0,94650
3,19E-05	3,21E-06	3,9%	1,39	1,56275
3,14E-05	5,09E-06	4,2%	1,36	1,23298
7,41E-05	3,63E-06	6,9%	1,13	1,84614
1,51E-05	4,07E-06	2,2%	1,64	1,54347
6,07E-05	8,75E-05	9,2%	1,00	0,97647

Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit
Version 2.00

required input
optional input

Assay Plate Parameters

Lot Number:	DJLN
Date:	12.12.2012
Assay volume IA:	240,0 µl
Lipid content:	0,90 µl
γ:	1,80

Quality Control Parameters	
Saturation Threshold	99,9% compound bound
Outlier Threshold	1,5 standard deviations
Threshold for outlier detection	0,98 r ²
Max difference of references:	30%
MS saturation threshold	100000000
model choice threshold	0,8 r ²

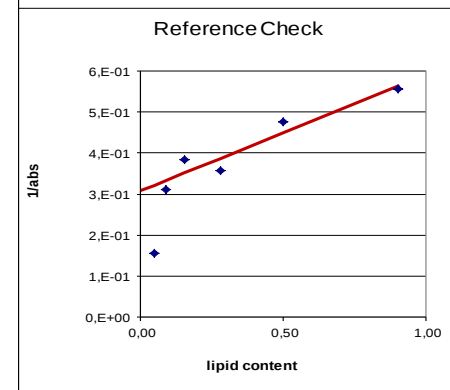
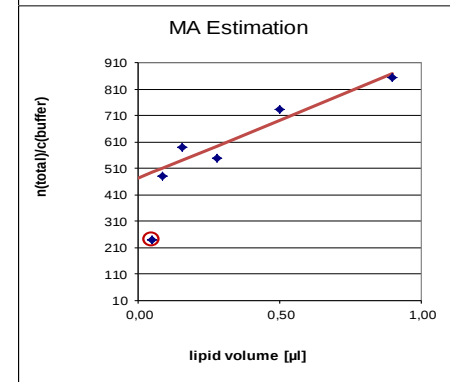
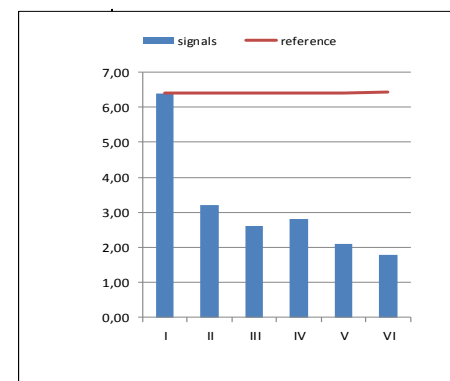
Compound name		sample volume [µL]	stock conc. [µM]	logMA		r ²	TQI ¹	
		15,0 µl	80,0 µM					
No 13	SL12	15,0 µl	80,0 µM	3,16	± 0,08	0,9896	●	8,3
No 14	SL13	15,0 µl	80,0 µM	2,96	± 0,15	0,8178	●	7,4
No 15	Doxorubicin	15,0 µl	80,0 µM	2,83	± 0,04	0,9814	●	9,5

¹ TQI (Transil Quality Index): between 7 and 10: good data quality | between 5 and 7: compromised data quality | below 5: poor data quality

Intestinal Permeability Coefficient								
Please enter the molecular weight and number of halogen atoms of the parent molecule (without counterions)								
Compound name		MW parent molecule; without counterion	Number of atoms				MW _{eff}	Predicted P _{int} [cm/sec]
			Fluorine	Chlorine	Bromine	Iodine		
No 13	SL12	270,00					270	2,32E-05
No 14	SL13	703,00					703	1,83E-06
No 15	Doxorubicin	580,00		1			558	3,38E-06

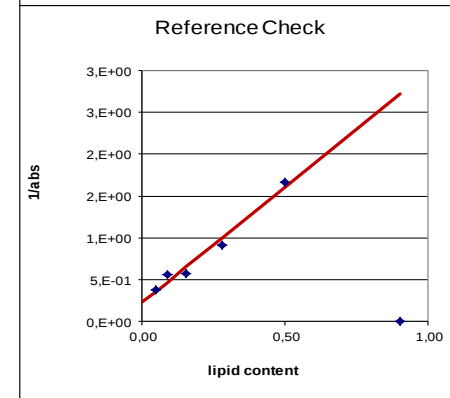
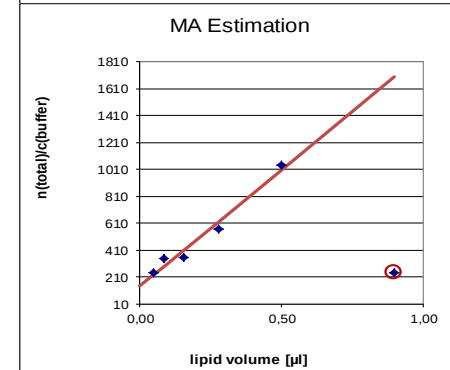
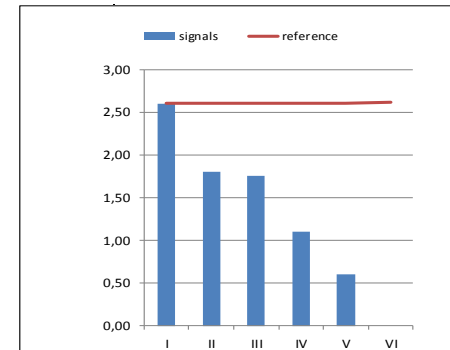
Volume of Distribution				
plasma protein binding data e.g. from TRANSIL HSA and AGP Binding experiments			logK ^{B/F}	Predicted VD [L/kg]
K _D ^{HSA} [mol/L]	K _D ^{AGP} [mol/L]	free fraction f _u		
9,24E-05	2,46E-05	12,2%	0,86	3,35477
1,05E-06	3,15E-05	0,2%	2,75	0,60090
3,29E-04	4,21E-04	35,3%	0,26	3,57729

test article No 1 SL5						
5,00 μ M 0 nm / amu						
Ref 1	2,20	R	av ref too low			
Ref 2	1,60	ref diff ok	max ref too low			
Signal Reference:	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40	6,40
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	6,40	6,40	6,40	6,41	6,41	6,42
Signal in TRANSIL wells:	6,40	3,20	2,60	2,80	2,10	1,80
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	reference	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	reference	ok	ok	ok	ok	ok
	outlier	ok	ok	ok	ok	ok
0,0						
QC index: 7,4 logMA: 2,64 $\pm$ 0,12 r^2 : 0,91886						
warning messages: poor reference quality: solubility problem? poor intercept fit,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		1,56E-01	3,13E-01	3,85E-01	3,57E-01	4,76E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		5,00	2,50	2,03	2,19	1,64
n(total)/c(buffer)		240	480	591	549	731
binding		0%	50%	59%	56%	67%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [uM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	1	1	3	4
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	783	1187	2256	3400
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		240,000	480,000	590,769	548,571	731,429
slope		572,63494				
intercept		386,43500				
r^2		0,7707				
prediction		413,710	435,529	474,805	545,500	672,752
residuals		-173,710	44,471	115,965	3,071	58,676
standardized residuals		0,000	0,439	1,144	0,030	0,579
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	0	1	1	1	1
			0,086	0,154	0,278	0,500
			480,000	590,769	548,571	731,429
						853,333
slope		437,77444				
intercept		472,90489	2,64			
r^2		0,9189				
prediction	472,905	493,756	510,437	540,463	594,509	691,792
						866,902
outlier						
lipid content [ul]		0,048				
n(total)/c(buffer)		240,000				
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		1,00	0,50	0,41	0,44	0,33
compound bound		0,00	0,50	0,59	0,56	0,67
valid log lipid			-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound			0,500	0,594	0,563	0,672
slope		0,20199				
intercept		0,72174				
r^2		0,8782				



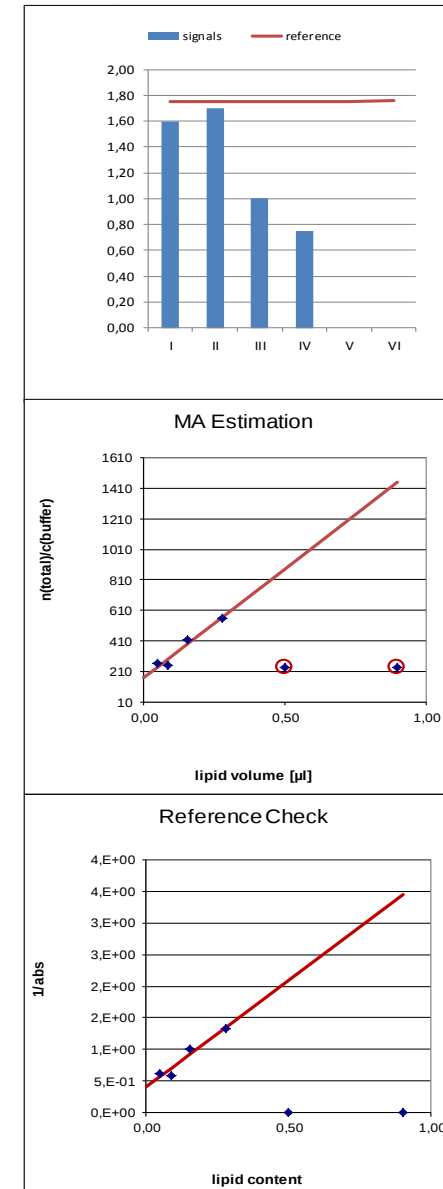
reg	2,64 $\pm$ 0,12	0,91886
avg	3,13 $\pm$ 0,12	1
choice	2,64E+00 $\pm$ 0,12	

test article No 2 SL4						
5,00 μ M 0 nm / amu						
Ref 1	2,50	R	av ref too low			
Ref 2	2,10	ref diff ok	max ref too low			
Signal Reference:	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60	2,60
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	2,60	2,60	2,60	2,60	2,61	2,61
Signal in TRANSIL wells:	2,60	1,80	1,75	1,10	0,60 na	ok
-						
missing values						
1 1 1 1 1 0						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	inconsistent	
saturation	reference	ok	ok	ok	ok	na
statistics	reference	ok	ok	ok	ok	na
QC index: 7,3 logMA: 3,24 $\pm$ 0,07 r^2 : 0,97470						
warning messages: poor reference quality: solubility problem? data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	5	1	1	1	1	0
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	1	1	1	0
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		3,85E-01	5,56E-01	5,71E-01	9,09E-01	1,67E+00
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		5,00	3,46	3,37	2,12	1,15
n(total)/c(buffer)		240	347	357	567	1040
binding		0%	31%	33%	58%	77%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [uM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	1	2	3	3
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	1273	2157	2200	2970
saturation threshold		99,9%				4934210526
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well		1	1	1	1	0
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	0
statistical outlier detection & removal						
lipid content [ul]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		240,000	346,667	356,571	567,273	1040,000
slope		1724,11679				
intercept		142,70578				
r^2		0,9747				
prediction		224,825	290,521	408,773	621,627	1004,764
residuals		15,175	56,146	-52,202	-54,354	35,236
standardized residuals		0,299	1,106	0,000	0,000	0,694
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	1	1	1	1	0
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
		240,000	346,667	356,571	567,273	1040,000
slope		1724,11679	3,24			
intercept		142,70578				
r^2		0,9747				
prediction	142,706	224,825	290,521	408,773	621,627	1004,764
outlier						
lipid content [ul]						0,900
n(total)/c(buffer)						239,100
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		1,00	0,69	0,67	0,42	0,23
compound bound		0,00	0,31	0,33	0,58	0,77
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound		0,000	0,308	0,327	0,577	0,769
slope		0,70814				
intercept		0,97086				
r^2		0,9571				



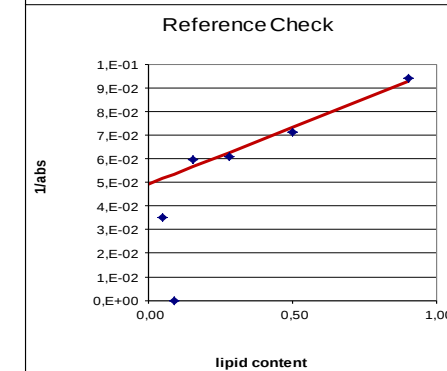
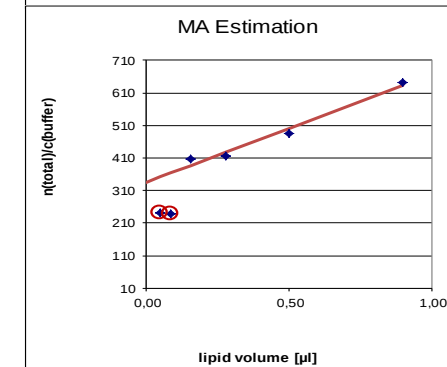
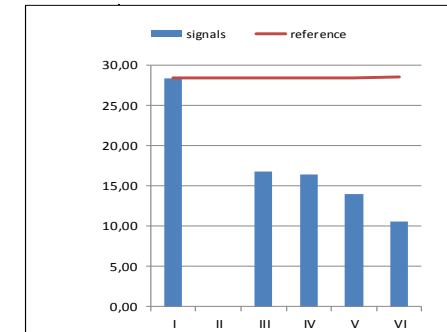
reg	3,24 $\pm$ 0,07	0,97470
avg	3,06 $\pm$ 0,07	1
choice	3,24E+00 $\pm$ 0,07	

test article No 3 SL3						
5,00 μM 0 nm / amu Ref 1 1,90 A av ref ok Ref 2 1,60 ref diff ok max ref ok Signal Reference: 1,75 I 1,75 II 1,75 III 1,75 IV 1,75 V 1,75 VI adjusted reference: 1,75 1,75 1,75 1,75 1,75 1,76 Signal in TRANSIL wells: 1,60 1,70 1,00 0,75 na na na ok						
missing values 1 1 1 1 0 0 outlier detection ok ok ok ok inconsistent inconsistent consistency ok ok ok ok na na saturation ok ok ok ok na na statistics ok ok ok ok na na						
QC index: 6,5 logMA: 3,15 $\pm$ 0,27 r^2: 0,94519 warning messages: references exceed signal: solubility problem? data not consistent,						
consistency check signal < reference 4 1 1 1 0 0 binding > 0% 1 1 1 1 1 1 steady increase in binding & summary 4 1 1 1 0 0						
removal of outliers due to saturation lipid content 0 0,05 0,09 0,15 0,28 0,50 0,90 1/signal in TRANSIL well 6,25E-01 5,88E-01 1,00E+00 1,33E+00 na na nt [nmol] 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 1,2 c(buffer)* [umol/l] 4,57 4,86 2,86 2,14 5,01 5,02 n(total)/c(buffer) 263 247 420 560 240 239 binding 9% 3% 43% 57% 0% 0% Lipid concentration [ul/ml]: 0,20 0,36 0,64 1,16 2,08 3,75 Lipid concentration [uM]: 261 470 846 1523 2741 4934 Molecular ratio lipid:total cmp 218 2 2 3 11 21 Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio) 2539 13709 1645 2221 2741228070 4934210526 saturation threshold 99,9% systematic outlier (saturation) 1 1 1 1 1 1 consistent saturation 1 1 1 1 1 1 bead level saturation (mol_ratio < 40) 1 1 1 1 1 1 valid lipid conc. valid c(lipid)/c(buffer) in well outlier due to saturation and consistency 1 1 1 1 0 0						
statistical outlier detection & removal lipid content [ul] 0,048 0,086 0,154 0,278 n(total)/c(buffer) 262,500 247,059 420,000 560,000 slope 1418,32359 171,88748 intercept 171,88748 r^2 0,9452 prediction 239,442 293,486 390,765 565,866 residuals 23,058 -46,427 29,235 -5,866 standardized residuals 0,668 0,000 0,847 0,000 Threshold 1,5 statistical outlier 4 1 1 1 0 0 slope 1418,32359 3,15 intercept 171,88748 r^2 0,9452 prediction 171,887 239,442 293,486 390,765 565,866 881,049 1448,379						
outlier lipid content [ul] 0,500 0,900 n(total)/c(buffer) 239,500 239,100						
binding QC log lipid -1,32 -1,07 -0,81 -0,56 -0,30 -0,05 compound free 0,91 0,97 0,57 0,43 1,00 1,00 compound bound 0,09 0,03 0,43 0,57 0,00 0,00 valid log lipid -1,322 -1,067 -0,812 -0,566 valid compound bound 0,086 0,029 0,429 0,571 slope 0,72751 intercept 0,96186 r^2 0,8292						



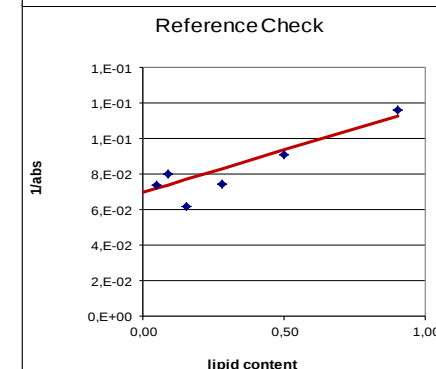
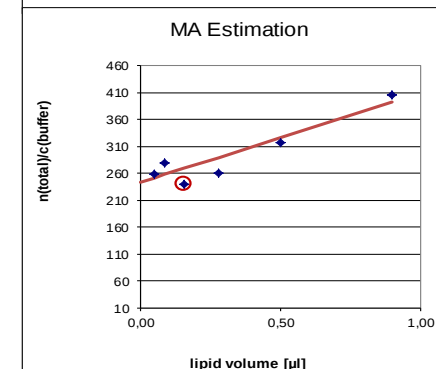
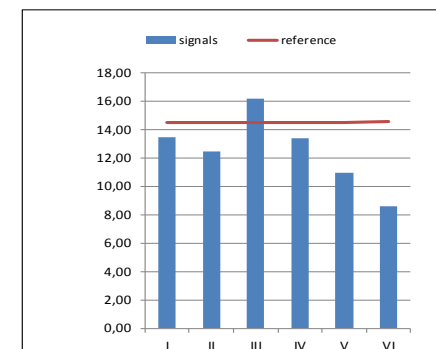
reg	3,15 $\pm$ 0,27	0,94519
avg	2,68 $\pm$ 0,27	1
choice	3,15E+00 $\pm$ 0,27	

test article No 4 SL1							
5,00 µM 0 nm / amu							
Ref 1	20,80	R	av ref too low				
Ref 2	19,10	ref diff ok	max ref too low				
Signal Reference:	28,40	28,40	28,40	28,40	28,40	28,40	
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI	
adjusted reference:	28,41	28,41	28,42	28,43	28,46	28,51	
Signal in TRANSIL wells:	28,40 na		16,80	16,40	14,00	10,60	ok
-							
missing values							
1 0 1 1 1 1							
outlier detection							
consistency	ok	inconsistent	ok	ok	ok	ok	
saturation	reference	na	ok	ok	ok	ok	
statistics	reference	na	ok	ok	ok	ok	
	outlier	na	ok	ok	ok	ok	
0,0							
QC index: 7,0 logMA: 2,52 ± 0,09 r ² : 0,97789							
warning messages: poor reference quality: solubility problem? data not consistent,							
consistency check							
signal < reference	5	1	0	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	0	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation							
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90
1/signal in TRANSIL well		3,52E-02 na		5,95E-02	6,10E-02	7,14E-02	9,43E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		5,00	5,00	2,96	2,89	2,46	1,87
n(total)/c(buffer)		240	240	406	416	487	643
binding		0%	0%	41%	42%	51%	63%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08	3,75
Lipid concentration [µM]:		261	470	846	1523	2741	4934
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	2	4	6	8
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	470032248	1726	3004	4505	6560
saturation threshold		99,9%					
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1	1
valid lipid conc:							
valid c(lipid)/c(buffer) in well							
outlier due to saturation and consistency		1	0	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal							
lipid content [µl]		0,048		0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)		240,000		405,714	415,610	486,857	643,019
slope		411,46503					
intercept		283,55149					
r ²		0,9076					
prediction		303,150		347,049	397,847	489,284	653,870
residuals		-63,150		58,665	17,762	-2,427	-10,851
standardized residuals		0,000		1,323	0,400	0,000	0,000
Threshold		1,5					
statistical outlier	4	0	0	1	1	1	1
				0,154	0,278	0,500	0,900
				405,714	415,610	486,857	643,019
slope		330,93704	2,52				
intercept		336,22268					
r ²		0,9779					
prediction	336,223	351,985	364,595	387,293	428,150	501,691	634,066
outlier							
lipid content [µl]		0,048	0,086				
n(total)/c(buffer)		240,000	239,914				
binding QC							
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30	-0,05
compound free		1,00	1,00	0,59	0,58	0,49	0,37
compound bound		0,00	0,00	0,41	0,42	0,51	0,63
valid log lipid				-0,812	-0,556	-0,301	-0,046
valid compound bound				0,408	0,423	0,507	0,627
slope		0,28967					
intercept		0,61537					
r ²		0,9055					



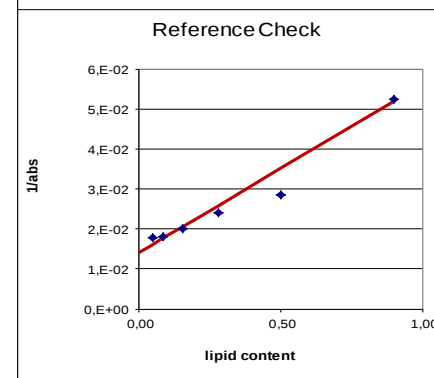
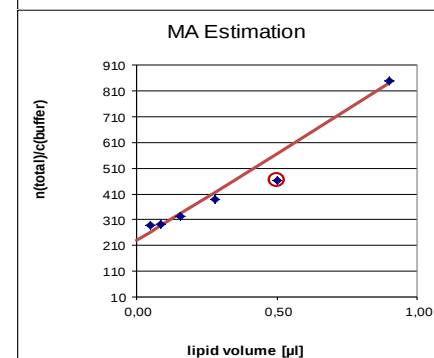
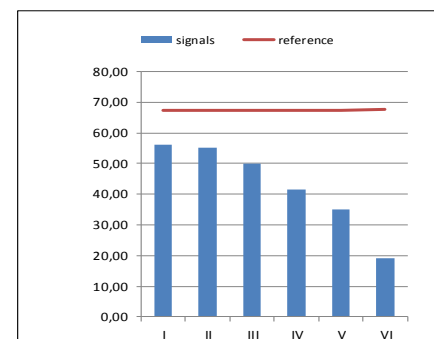
reg	2,52 ± 0,09	0,97789
avg	2,79 ± 0,09	1
choice	2,52E+00 ± 0,09	

test article No 5 SL2						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	15,60	A	av ref ok			
Ref 2	13,40	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	14,50	14,50	14,50	14,50	14,50	14,50
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	14,50	14,51	14,51	14,52	14,53	14,55
Signal in TRANSIL wells:	13,50	12,50	16,20	13,40	11,00	8,60
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	inconsistent	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	na	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	type 2	ok	ok	ok
0,0						
QC index: 8,3 logMA: 2,22 ± 0,14 r²: 0,89341						
warning messages: data not consistent,						
consistency check						
signal < reference	5	1	0	1	1	1
binding > 0%		1	0	1	1	1
steady increase in binding & summary	5	1	0	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		7,41E-02	8,00E-02	6,17E-02	7,46E-02	9,09E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		4,66	4,31	5,00	4,62	3,79
n(total)/c(buffer)		258	278	240	260	316
binding		7%	14%	-12%	8%	24%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [µM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	4	6	9
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		3155	2840	-6014	16729	9464
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	0	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	0	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,048	0,086	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)		257,778	278,400	259,701	316,364	404,651
slope		165,44942				
intercept		243,44835				
r²		0,8934				
prediction		251,329	257,633	289,407	326,173	392,353
residuals		6,449	20,767	-29,705	-9,809	12,298
standarized residuals		0,322	1,037	0,000	0,000	0,614
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	1	1	0	1	1
		0,048	0,086	0,278	0,500	0,900
		257,778	278,400	259,701	316,364	404,651
slope		165,44942	2,22			
intercept		243,44835				
r²		0,8934				
prediction	243,448	251,329	257,633	268,981	289,407	326,173
outlier						
lipid content [µl]			0,154			
n(total)/c(buffer)			239,846			
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		0,93	0,86	1,12	0,92	0,76
compound bound		0,07	0,14	-0,12	0,08	0,24
valid log lipid		-1,322	-1,067		-0,556	-0,301
valid compound bound		0,069	0,138		0,076	0,241
slope		0,21519				
intercept		0,32789				
r²		0,6488				



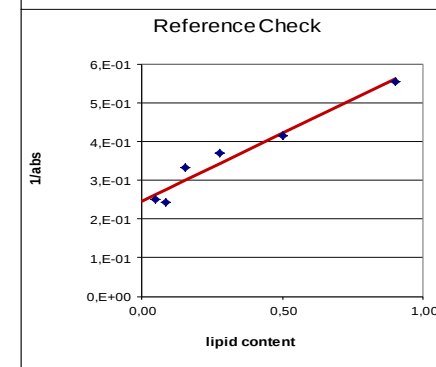
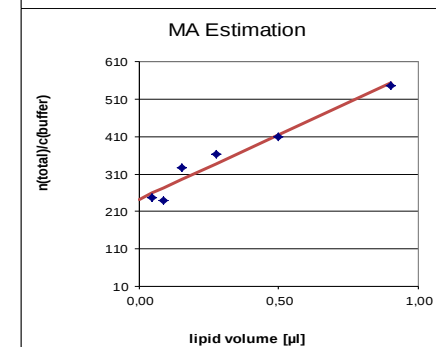
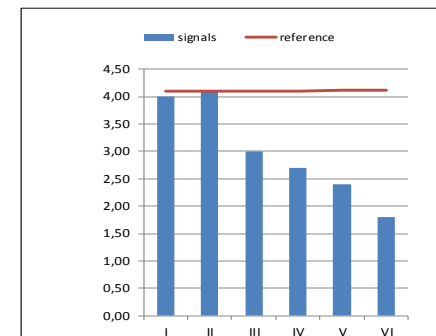
reg	2,22 ± 0,14	0,89341
avg	2,30 ± 0,14	1
choice	2,22E+00 ± 0,14	

test article No 6 SL6						
	5,00 μ M				0 nm / amu	
Ref 1	70,60	A		av ref ok		
Ref 2	63,90	ref diff ok		max ref ok		
Signal Reference:	67,25	67,25	67,25	67,25	67,25	67,25
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	67,26	67,27	67,29	67,33	67,39	67,50
Signal in TRANSIL wells:	56,20	55,20	50,00	41,50	35,00	19,00
						ok
	missing values					
	1	1	1	1	1	1
	outlier detection					
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	outlier	0,0
QC index:	9,6	logMA:	2,83 $\pm$ 0,05	r ² :	0,99244	
warning messages:						
	consistency check					
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
	removal of outliers due to saturation					
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		1,78E-02	1,81E-02	2,00E-02	2,41E-02	2,86E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [umol/l]		4,18	4,10	3,72	3,09	2,60
n(total)/c(buffer)		287	292	323	389	461
binding		16%	18%	26%	38%	48%
Lipid concentration [ul/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [uM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	3	4	6
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1324	2186	2749	3314	4764
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well		1	1	1	1	1
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
	statistical outlier detection & removal					
lipid content [ul]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		287,189	292,391	322,800	388,916	461,143
slope		644,25631				
intercept		222,60841				
r ²		0,9533				
prediction		253,294	277,843	322,031	401,568	544,737
residuals		33,894	14,548	0,769	-12,653	-83,594
standarized residuals		0,732	0,314	0,017	0,000	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	5	1	1	1	1	0
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
		287,189	292,391	322,800	388,916	461,143
slope		679,47709	2,83			
intercept		229,00420				
r ²		0,9924				
prediction	229,004	261,368	287,258	333,862	417,748	568,743
						840,534
	outlier					
lipid content [ul]					0,500	
n(total)/c(buffer)					461,143	
	binding QC					
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		0,84	0,82	0,74	0,62	0,52
compound bound		0,16	0,18	0,26	0,38	0,48
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,306
valid compound bound		0,164	0,179	0,257	0,383	0,471
slope		0,44664				
intercept		0,67976				
r ²		0,9249				



reg	2,83 $\pm$ 0,05	0,99244
avg	2,81 $\pm$ 0,05	1
choice	2,83E+00 $\pm$ 0,05	

test article No 7 SL7																																																																																																																																				
5,00 μM 0 nm / amu Ref 1 4,10 A av ref ok Ref 2 4,10 ref diff ok max ref ok Signal Reference: 4,10 4,10 4,10 4,10 4,10 4,10 TRANSIL well: I II III IV V VI adjusted reference: 4,10 4,10 4,10 4,10 4,11 4,12 Signal in TRANSIL wells: 4,00 4,10 3,00 2,70 2,40 1,80 ok																																																																																																																																				
<table> <tr><td colspan="7">missing values</td></tr> <tr><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td colspan="7">outlier detection</td></tr> <tr><td>consistency</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td></tr> <tr><td>saturation</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td></tr> <tr><td>statistics</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td><td>ok</td></tr> </table>							missing values							1	1	1	1	1	1	1	outlier detection							consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok	saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok	statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok																																																																																				
missing values																																																																																																																																				
1	1	1	1	1	1	1																																																																																																																														
outlier detection																																																																																																																																				
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok																																																																																																																														
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok																																																																																																																														
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok																																																																																																																														
QC index: 9,5 logMA: 2,54 %ZAH! r^2: 0,95458 warning messages:																																																																																																																																				
<table> <tr><td colspan="7">consistency check</td></tr> <tr><td>signal < reference</td><td>6</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>binding > 0%</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>steady increase in binding & summary</td><td>6</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> </table>							consistency check							signal < reference	6	1	1	1	1	1	binding > 0%		1	1	1	1	1	steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1																																																																																																		
consistency check																																																																																																																																				
signal < reference	6	1	1	1	1	1																																																																																																																														
binding > 0%		1	1	1	1	1																																																																																																																														
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1																																																																																																																														
<table> <tr><td colspan="7">removal of outliers due to saturation</td></tr> <tr><td>lipid content</td><td>0</td><td>0,05</td><td>0,09</td><td>0,15</td><td>0,28</td><td>0,50</td></tr> <tr><td>1/signal in TRANSIL well</td><td></td><td>2,50E-01</td><td>2,44E-01</td><td>3,33E-01</td><td>3,70E-01</td><td>4,17E-01</td></tr> <tr><td>nt [nmol]</td><td></td><td>1,2</td><td>1,2</td><td>1,2</td><td>1,2</td><td>1,2</td></tr> <tr><td>c(buffer)* [μmol/l]</td><td></td><td>4,88</td><td>5,00</td><td>3,66</td><td>3,29</td><td>2,93</td></tr> <tr><td>n(total)/c(buffer)</td><td></td><td>246</td><td>240</td><td>328</td><td>364</td><td>410</td></tr> <tr><td>binding</td><td></td><td>2%</td><td>0%</td><td>27%</td><td>34%</td><td>41%</td></tr> <tr><td>Lipid concentration [μl/ml]:</td><td></td><td>0,20</td><td>0,36</td><td>0,64</td><td>1,16</td><td>2,08</td></tr> <tr><td>Lipid concentration [μM]:</td><td></td><td>261</td><td>470</td><td>846</td><td>1523</td><td>2741</td></tr> <tr><td>Molecular ratio lipid:total cmp</td><td></td><td>218</td><td>2</td><td>3</td><td>4</td><td>7</td></tr> <tr><td>Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)</td><td></td><td>8922</td><td>470032248</td><td>2628</td><td>3717</td><td>5509</td></tr> <tr><td>saturation threshold</td><td></td><td>99,9%</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>systematic outlier (saturation)</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>consistent saturation</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>bead level saturation (mol_ratio < 40)</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>valid lipid conc.</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>valid c(lipid)/c(buffer) in well</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>outlier due to saturation and consistency</td><td></td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> </table>							removal of outliers due to saturation							lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	1/signal in TRANSIL well		2,50E-01	2,44E-01	3,33E-01	3,70E-01	4,17E-01	nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	c(buffer)* [μmol/l]		4,88	5,00	3,66	3,29	2,93	n(total)/c(buffer)		246	240	328	364	410	binding		2%	0%	27%	34%	41%	Lipid concentration [μl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08	Lipid concentration [μM]:		261	470	846	1523	2741	Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	3	4	7	Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		8922	470032248	2628	3717	5509	saturation threshold		99,9%					systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1	consistent saturation		1	1	1	1	1	bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1	valid lipid conc.							valid c(lipid)/c(buffer) in well							outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation																																																																																																																																				
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50																																																																																																																														
1/signal in TRANSIL well		2,50E-01	2,44E-01	3,33E-01	3,70E-01	4,17E-01																																																																																																																														
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2																																																																																																																														
c(buffer)* [μmol/l]		4,88	5,00	3,66	3,29	2,93																																																																																																																														
n(total)/c(buffer)		246	240	328	364	410																																																																																																																														
binding		2%	0%	27%	34%	41%																																																																																																																														
Lipid concentration [μl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08																																																																																																																														
Lipid concentration [μM]:		261	470	846	1523	2741																																																																																																																														
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	3	4	7																																																																																																																														
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		8922	470032248	2628	3717	5509																																																																																																																														
saturation threshold		99,9%																																																																																																																																		
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1																																																																																																																														
consistent saturation		1	1	1	1	1																																																																																																																														
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1																																																																																																																														
valid lipid conc.																																																																																																																																				
valid c(lipid)/c(buffer) in well																																																																																																																																				
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1																																																																																																																														
<table> <tr><td colspan="7">statistical outlier detection & removal</td></tr> <tr><td>lipid content [μl]</td><td></td><td>0,048</td><td>0,086</td><td>0,154</td><td>0,278</td><td>0,500</td></tr> <tr><td>n(total)/c(buffer)</td><td></td><td>246,000</td><td>240,000</td><td>328,000</td><td>364,444</td><td>410,000</td></tr> <tr><td>slope</td><td></td><td>345,00260</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>intercept</td><td></td><td>242,83690</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>r^2</td><td></td><td>0,9546</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>prediction</td><td></td><td>259,269</td><td>272,415</td><td>296,078</td><td>338,671</td><td>415,338</td></tr> <tr><td>residuals</td><td></td><td>-13,269</td><td>-32,415</td><td>31,922</td><td>25,773</td><td>-5,338</td></tr> <tr><td>standarized residuals</td><td></td><td>0,000</td><td>0,000</td><td>1,307</td><td>1,055</td><td>0,000</td></tr> <tr><td>Threshold</td><td></td><td>1,5</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>statistical outlier</td><td>6</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td><td>1</td></tr> <tr><td>lipid content [μl]</td><td></td><td>0,048</td><td>0,086</td><td>0,154</td><td>0,278</td><td>0,500</td></tr> <tr><td>n(total)/c(buffer)</td><td></td><td>246,000</td><td>240,000</td><td>328,000</td><td>364,444</td><td>410,000</td></tr> <tr><td>slope</td><td></td><td>345,00260</td><td>2,54</td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>intercept</td><td></td><td>242,83690</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>r^2</td><td></td><td>0,9546</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>prediction</td><td>242,837</td><td>259,269</td><td>272,415</td><td>296,078</td><td>338,671</td><td>415,338</td></tr> </table>							statistical outlier detection & removal							lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	n(total)/c(buffer)		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000	slope		345,00260					intercept		242,83690					r^2		0,9546					prediction		259,269	272,415	296,078	338,671	415,338	residuals		-13,269	-32,415	31,922	25,773	-5,338	standarized residuals		0,000	0,000	1,307	1,055	0,000	Threshold		1,5					statistical outlier	6	1	1	1	1	1	lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	n(total)/c(buffer)		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000	slope		345,00260	2,54				intercept		242,83690					r^2		0,9546					prediction	242,837	259,269	272,415	296,078	338,671	415,338							
statistical outlier detection & removal																																																																																																																																				
lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500																																																																																																																														
n(total)/c(buffer)		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000																																																																																																																														
slope		345,00260																																																																																																																																		
intercept		242,83690																																																																																																																																		
r^2		0,9546																																																																																																																																		
prediction		259,269	272,415	296,078	338,671	415,338																																																																																																																														
residuals		-13,269	-32,415	31,922	25,773	-5,338																																																																																																																														
standarized residuals		0,000	0,000	1,307	1,055	0,000																																																																																																																														
Threshold		1,5																																																																																																																																		
statistical outlier	6	1	1	1	1	1																																																																																																																														
lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500																																																																																																																														
n(total)/c(buffer)		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000																																																																																																																														
slope		345,00260	2,54																																																																																																																																	
intercept		242,83690																																																																																																																																		
r^2		0,9546																																																																																																																																		
prediction	242,837	259,269	272,415	296,078	338,671	415,338																																																																																																																														
<table> <tr><td colspan="7">outlier</td></tr> <tr><td>lipid content [μl]</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>n(total)/c(buffer)</td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>							outlier							lipid content [μl]							n(total)/c(buffer)																																																																																																															
outlier																																																																																																																																				
lipid content [μl]																																																																																																																																				
n(total)/c(buffer)																																																																																																																																				
<table> <tr><td colspan="7">binding QC</td></tr> <tr><td>log lipid</td><td></td><td>-1,32</td><td>-1,07</td><td>-0,81</td><td>-0,56</td><td>-0,30</td></tr> <tr><td>compound free</td><td></td><td>0,98</td><td>1,00</td><td>0,73</td><td>0,66</td><td>0,59</td></tr> <tr><td>compound bound</td><td></td><td>0,02</td><td>0,00</td><td>0,27</td><td>0,34</td><td>0,41</td></tr> <tr><td>valid log lipid</td><td></td><td>-1,322</td><td>-1,067</td><td>-0,812</td><td>-0,556</td><td>-0,301</td></tr> <tr><td>valid compound bound</td><td></td><td>0,024</td><td>0,000</td><td>0,268</td><td>0,341</td><td>0,415</td></tr> <tr><td>slope</td><td></td><td>0,44770</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>intercept</td><td></td><td>0,57449</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> <tr><td>r^2</td><td></td><td>0,9371</td><td></td><td></td><td></td><td></td></tr> </table>							binding QC							log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30	compound free		0,98	1,00	0,73	0,66	0,59	compound bound		0,02	0,00	0,27	0,34	0,41	valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301	valid compound bound		0,024	0,000	0,268	0,341	0,415	slope		0,44770					intercept		0,57449					r^2		0,9371																																																																			
binding QC																																																																																																																																				
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30																																																																																																																														
compound free		0,98	1,00	0,73	0,66	0,59																																																																																																																														
compound bound		0,02	0,00	0,27	0,34	0,41																																																																																																																														
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301																																																																																																																														
valid compound bound		0,024	0,000	0,268	0,341	0,415																																																																																																																														
slope		0,44770																																																																																																																																		
intercept		0,57449																																																																																																																																		
r^2		0,9371																																																																																																																																		



reg	2,54 %ZAH!	0,95458
avg	#ZAH!	#ZAH!
choice	2,54E+00	#ZAH!

reference QC												
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90					
1/signal in TRANSIL well		2,50E-01	2,44E-01	3,33E-01	3,70E-01	4,17E-01	5,56E-01					
valid lipid content		0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90					
valid 1/signal		2,50E-01	2,44E-01	3,33E-01	3,70E-01	4,17E-01	5,56E-01					
slope		0,35061										
intercept		0,24679										
r ²		0,9546										
predicted 1/signal	0	0,26	0,28	0,30	0,34	0,42	0,56					
Predicted Reference Value		4,05										
Actual Reference Value		4,10										
Relative deviation		1,2%										
QC index: 9,5												
no. data points	10	reference	10	r ² MA predictic	7	ref. Treatment	10	ref > signal	10	consistency	10	warning messages
		10,0%	10	0,9999		A	10	6	10	6	10	data points
6	10	20,0%	9	0,999		M		5		5		reference
5		50,0%	8	0,99		R		4		4		ref. Treatment
4		100,0%	7	0,9	7	slopes	10	5		3		ref > signal
3		200,0%	5	0,8	6	1/abs > 0	5	2		2		consistency
2		500,0%	3	0,7	5	:mp bound > 0	5	1		1		r ² MA prediction
1		<500%		0,6	4	id)/c(buffer) >0	10	0		1,01	10	slopes
0				0,5	3							intercept
				<0,5								summary
1. step outlier detection												
mean x		0,328		n	6							
(x _i -mean(x)) ²		0,08	0,06	0,03	0,00	0,03	0,33					
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,53										
residuals		-13,269	-32,415	31,922	25,773	-5,338	-6,673					
		596,6264										
s ²		44,0189	262,6881	254,7528	166,0682	7,1241	11,1308					
studentized residual		-0,59	-1,40	1,33	1,04	-0,22	-0,53					
		0,59	1,40	1,33	1,04	0,22	0,53					
		1	1	1	1	1	1					
slope		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
intercept		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000	546,667					
r ²		345,00260	#BEZUG!									
		242,83690										
		0,9546										
2. step outlier detection												
mean x		0,328		n	6							
(x _i -mean(x)) ²		0,08	0,06	0,03	0,00	0,03	0,33					
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,53										
residuals		-13,269	-32,415	31,922	25,773	-5,338	-6,673					
		44,0189	262,6881	254,7528	166,0682	7,1241	11,1308					
s ²		745,7830										
studentized residual		-0,59	-1,40	1,33	1,04	-0,22	-0,53					
		0,59	1,40	1,33	1,04	0,22	0,53					
		1	1	1	1	1	1					
slope		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
intercept		246,000	240,000	328,000	364,444	410,000	546,667					
r ²		345,00260	2,54									
		242,83690										
		0,9546										
Standard Error												
		I	II	III	IV	V	VI					
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200					
V _{lipid} [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
V _{buffer} [μl]		239,952	239,914	239,846	239,722	239,500	239,100					
c _{buffer}		4,879	5,002	3,661	3,296	2,933	2,203					
c _{lipid} [μM]		614,494	0,000	2086,244	1475,122	995,122	747,967					
logMA		2,1	#ZAH!	2,8	2,7	2,5	2,5					
mean		#ZAH!										
SE(logMA)		#ZAH!										
max		#ZAH!										
min		#ZAH!										
logMA		2,1	0,0	2,8	2,7	2,5	2,5					

initial r2: 0,9546
skip outlier detection if r2 > 0,98
consider outlier detection

check, if estimation of reference assay volume becomes worse after outlier detection

checking effect of outlier removal on intercept estimation of nt/c

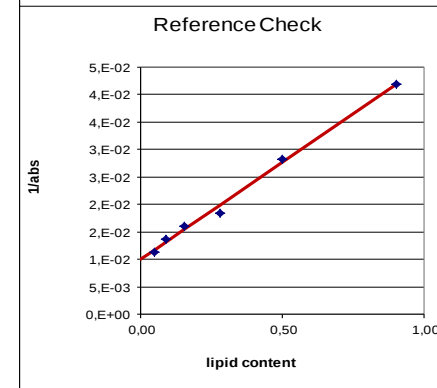
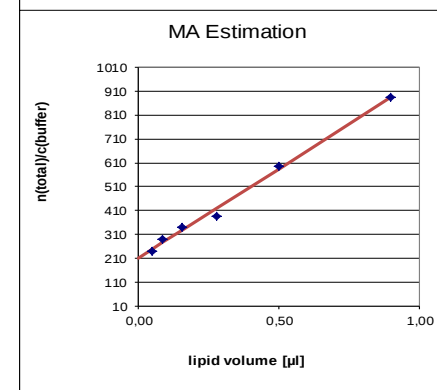
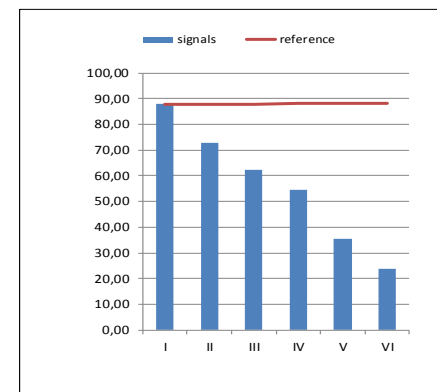
	1	1	1	1	1	1
lipid content	0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)	246,0	240,000	328,000	364,444	410,000	546,667
	345,00260	w/o outlier	with outlier			
	242,83690	2,837	2,837	0,00 ok		
	0,9546	improvement? no		1,0		
		accept outlier na				
abs(studentized residuals)	0,59	1,40	1,33	1,04	0,22	0,53
	0,04762993	0,08573388	0,15432099	0,27777778	0,5	0,9
	246,0		328,0	364,4	410,0	546,7

second tier r2: 0,9546
skip outlier detection if r2 > 0,98
consider outlier detection

no outliers will be recorded if there are only 3 or less points left at step 1 or 2

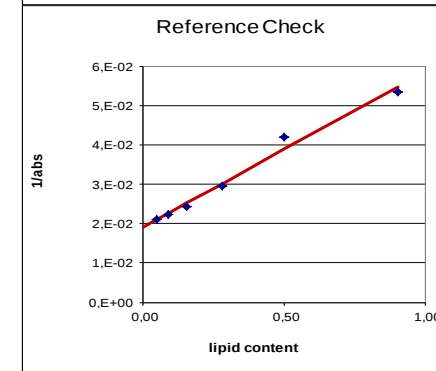
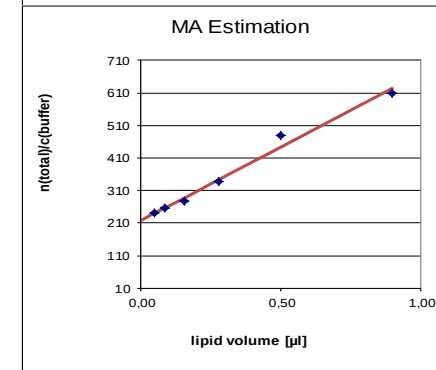
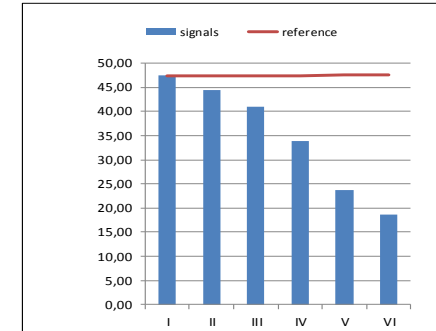
well	logMA
I	2,1
II	0,0
III	2,8
IV	2,7
V	2,5
VI	2,5

test article No 8 SL14						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	45,90	R	av ref too low			
Ref 2	82,80	high ref diff	max ref too low			
Signal Reference:	87,90	87,90	87,90	87,90	87,90	87,90
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	87,92	87,93	87,96	88,00	88,08	88,23
Signal in TRANSIL wells:	87,90	72,80	62,30	54,50	35,30	23,90
ok						
Ref 1 <> Ref 2						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
1 1 1 1 1 1						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	reference	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	reference	ok	ok	ok	ok	ok
0,0						
QC index: 8,6 logMA: 2,87 ± 0,03 r²: 0,99467						
warning messages: poor reference quality: solubility problem?						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,50	0,90
1/signal in TRANSIL well		1,14E-02	1,37E-02	1,61E-02	1,83E-02	4,18E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		5,00	4,14	3,54	3,10	1,36
n(total)/c(buffer)		240	290	339	387	883
binding		0%	17%	29%	38%	73%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	3,75
Lipid concentration [µM]:		261	470	846	1523	4934
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	2	4	6
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	2280	2421	3340	3817
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		240,000	289,780	338,620	387,083	597,620
slope		746,26012				
intercept		211,50571				
r²		0,9947				
prediction		247,050	275,485	326,669	418,800	584,636
residuals		-7,050	14,295	11,950	-31,718	12,985
standarized residuals		0,000	0,806	0,674	0,000	0,732
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
		240,000	289,780	338,620	387,083	597,620
		746,26012	2,87			
		211,50571				
		0,9947				
prediction	211,506	247,050	275,485	326,669	418,800	584,636
outlier						
lipid content [µl]						
n(total)/c(buffer)						
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		1,00	0,83	0,71	0,62	0,40
compound bound		0,00	0,17	0,29	0,38	0,60
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound		0,000	0,172	0,291	0,380	0,598
slope		0,56064				
intercept		0,74503				
r²		0,9889				



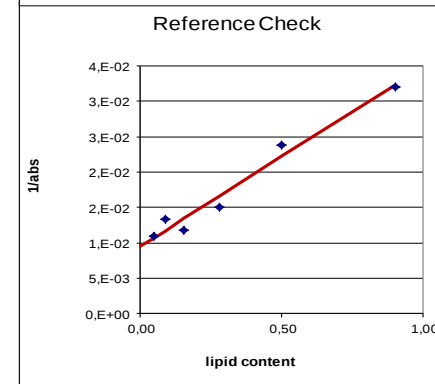
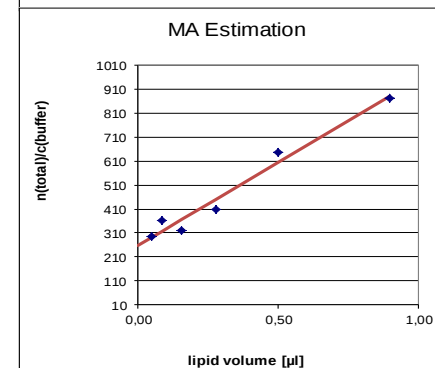
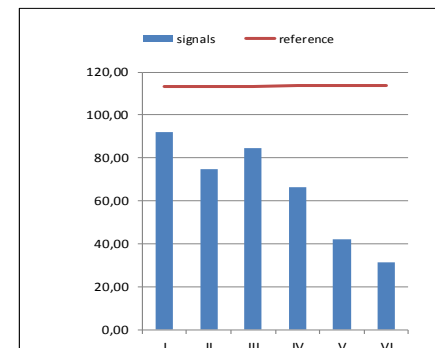
reg	2,87 ± 0,03	0,99467
avg	2,80 ± 0,03	1
choice	2,87E+00 ± 0,03	

test article No 9 SL8							
5,00 μ M 0 nm / amu							
Ref 1	34,90	R	av ref too low				
Ref 2	33,20	ref diff ok	max ref too low				
Signal Reference:	47,40	47,40	47,40	47,40	47,40	47,40	
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI	
adjusted reference:	47,41	47,42	47,43	47,45	47,50	47,58	
Signal in TRANSIL wells:	47,40	44,50	41,00	33,80	23,80	18,70	ok
-							
missing values							
1 1 1 1 1 1							
outlier detection							
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok	
saturation	reference	ok	ok	ok	ok	ok	
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok	
0,0							
QC index: 9,3 logMA: 2,65 $\pm$ 0,08 r^2 : 0,98539							
warning messages: poor reference quality: solubility problem?							
consistency check							
signal < reference	6	1	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation							
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90
1/signal in TRANSIL well		2,11E-02	2,25E-02	2,44E-02	2,96E-02	4,20E-02	5,35E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [μmol/l]		5,00	4,69	4,32	3,57	2,51	1,97
n(total)/c(buffer)		240	256	277	337	478	608
binding		0%	6%	14%	29%	50%	61%
Lipid concentration [μl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08	3,75
Lipid concentration [μM]:		261	470	846	1523	2741	4934
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	3	5	6	8
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	6402	5222	4423	4588	6791
saturation threshold		99,9%					
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1	1
valid lipid conc.							
valid c(lipid)/c(buffer) in well							
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal							
lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)		240,000	255,640	277,463	336,568	477,983	608,342
slope		449,54388					
intercept		218,73928					
r^2		0,9854					
prediction		240,151	257,280	288,113	343,613	443,511	623,329
residuals		-0,151	-1,640	-10,650	-7,045	34,472	-14,987
standarized residuals		0,000	0,000	0,000	0,000	1,940	0,000
Threshold		1,5					
statistical outlier	6	1	1	1	1	1	1
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
		240,000	255,640	277,463	336,568	477,983	608,342
slope		449,54388	2,65				
intercept		218,73928					
r^2		0,9854					
prediction	218,739	240,151	257,280	288,113	343,613	443,511	623,329
outlier							
lipid content [μl]							
n(total)/c(buffer)							
binding QC							
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30	-0,05
compound free		1,00	0,94	0,86	0,71	0,50	0,39
compound bound		0,00	0,06	0,14	0,29	0,50	0,61
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301	-0,046
valid compound bound		0,000	0,061	0,135	0,287	0,498	0,605
slope		0,50248					
intercept		0,60808					
r^2		0,9620					



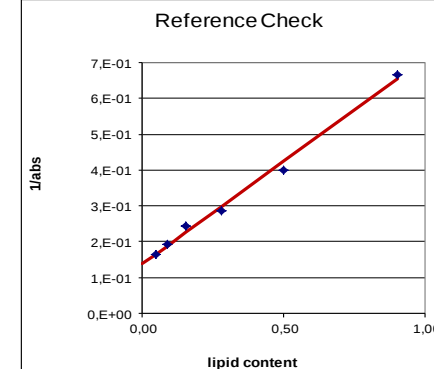
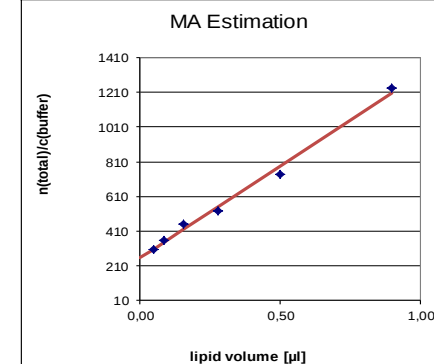
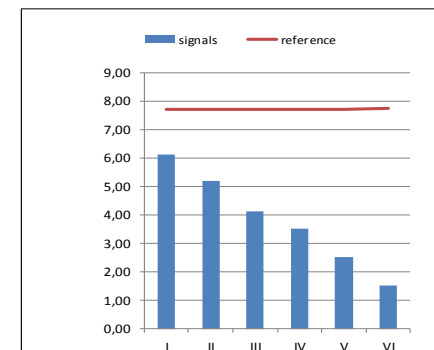
reg	2,65 $\pm$ 0,08	0,98539
avg	2,49 $\pm$ 0,08	1
choice	2,65E+00 $\pm$ 0,08	

test article No 10 SL9						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	118,30	A	av ref ok			
Ref 2	108,50	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	113,40	113,40	113,40	113,40	113,40	113,40
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	113,42	113,44	113,47	113,53	113,64	113,83
Signal in TRANSIL wells:	92,00	74,90	84,80	66,50	42,00	31,20
ok						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
1 1 1 1 1 1						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok
0,0						
QC index:	9,5	logMA:	2,84 ± 0,07	r ² :	0,97017	
warning messages:						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		1,09E-02	1,34E-02	1,18E-02	1,50E-02	2,38E-02
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		4,06	3,30	3,74	2,93	1,85
n(total)/c(buffer)		296	363	321	409	648
binding		19%	34%	25%	41%	63%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [µM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	1	3	4	4
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1153	1154	2796	3069	3628
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		295,826	363,364	320,943	409,263	648,000
slope		691,74550				
intercept		258,35082				
r ²		0,9702				
prediction		291,299	317,657	365,102	450,502	604,224
residuals		4,527	45,708	-44,158	-41,239	43,776
standarized residuals		0,115	1,161	0,000	0,000	1,112
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
		295,826	363,364	320,943	409,263	648,000
slope		691,74550	2,84			
intercept		258,35082				
r ²		0,9702				
prediction	258,351	291,299	317,657	365,102	450,502	604,224
outlier						
lipid content [µl]						
n(total)/c(buffer)						
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		0,81	0,66	0,75	0,59	0,37
compound bound		0,19	0,34	0,25	0,41	0,63
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound		0,189	0,340	0,252	0,414	0,630
slope		0,41552				
intercept		0,70894				
r ²		0,8754				



reg	2,84 ± 0,07	0,97017
avg	2,91 ± 0,07	1
choice	2,84E+00 ± 0,07	

test article No 11 SL10						
		5,00 μM	0 nm / amu			
Ref 1	6,60 A av ref ok					
Ref 2	8,80 ref diff ok max ref ok					
Signal Reference:	7,70	7,70	7,70	7,70	7,70	7,70
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	7,70	7,70	7,70	7,71	7,72	7,73
Signal in TRANSIL wells:	6,10	5,20	4,10	3,50	2,50	1,50
	-					
	missing values					
	1	1	1	1	1	1
	outlier detection					
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok
	0,0					
QC index:	9,7	logMA:	3,03 ± 0,03	r ² :	0,99291	
warning messages:						
	consistency check					
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%		1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
	removal of outliers due to saturation					
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		1,64E-01	1,92E-01	2,44E-01	2,86E-01	4,00E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [μmol/l]		3,96	3,38	2,66	2,27	1,62
n(total)/c(buffer)		303	355	451	528	739
binding		21%	32%	47%	55%	68%
Lipid concentration [μl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [μM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	1	2	3	4
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		1047	1206	1508	2327	3383
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
	statistical outlier detection & removal					
lipid content [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		302,951	355,385	450,732	528,000	739,200
slope		1058,43819				
intercept		254,65775				
r ²		0,9929				
prediction		305,071	345,402	417,997	548,668	783,877
residuals		-2,120	9,983	32,735	-20,668	-44,677
standarized residuals		0,000	0,344	1,128	0,000	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
		302,951	355,385	450,732	528,000	739,200
		1058,43819	3,03			
		254,65775				
		0,9929				
prediction	254,658	305,071	345,402	417,997	548,668	783,877
	outlier					
lipid content [μl]						
n(total)/c(buffer)						
	binding QC					
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		0,79	0,68	0,53	0,45	0,32
compound bound		0,21	0,32	0,47	0,55	0,68
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound		0,208	0,325	0,468	0,545	0,675
slope		0,46078				
intercept		0,81948				
r ²		0,9963				



reg	3,03 ± 0,03	0,99291
avg	3,07 ± 0,03	1
choice	3,03E+00 ± 0,03	

reference QC												
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90					
1/signal in TRANSIL well		1,64E-01	1,92E-01	2,44E-01	2,86E-01	4,00E-01	6,67E-01					
valid lipid content		0,05	0,09	0,15	0,28	0,50	0,90					
valid 1/signal		1,64E-01	1,92E-01	2,44E-01	2,86E-01	4,00E-01	6,67E-01					
slope		0,57275										
intercept		0,13780										
r ²		0,9929										
predicted 1/signal	0	0,17	0,19	0,23	0,30	0,42	0,65					
Predicted Reference Value		7,26										
Actual Reference Value		7,70										
Relative deviation		5,8%										
QC index: 9,7												
no. data points	10	reference	10	r ² MA predictic	8	ref. Treatment	10	ref > signal	10	consistency	10	warning messages
		10,0%	10	0,9999		A	10			6	10	data points
6	10	20,0%	9	0,999		M				5		reference
5		50,0%	8	0,99	8	R				5		ref. Treatment
4		100,0%	7	0,9	7	slopes	10			5		ref > signal
3		200,0%	5	0,8	6	1/abs > 0	5			4		consistency
2		500,0%	3	0,7	5	>mp bound > 0	5			2		r ² MA prediction
1		<500%		0,6	4	>id)/c(buffer) > 0	10			1		slopes
0				0,5	3			0		1,06	10	intercept
				<0,5								summary
1. step outlier detection												
mean x		0,328		n	6							
(x _i -mean(x)) ²		0,08	0,06	0,03	0,00	0,03	0,33					
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,53										
residuals		0,68	0,72	0,78	0,83	0,78	0,21					
		-2,120	9,983	32,735	-20,668	-44,677	24,748					
		842,2749										
		1,1239	24,9143	267,8907	106,7952	499,0051	153,1144					
s ²		1052,8436										
studentized residual		-0,08	0,36	1,14	-0,70	-1,56	1,66					
		0,08	0,36	1,14	0,70	1,56	1,66					
		1	1	1	1	1	1					
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
slope		302,951	355,385	450,732	528,000	739,200	1232,000					
intercept		1058,43819	#BEZUG!									
r ²		254,65775										
		0,9929										
2. step outlier detection												
mean x		0,328		n	6							
(x _i -mean(x)) ²		0,08	0,06	0,03	0,00	0,03	0,33					
Σ(x _i -mean(x)) ²		0,53										
residuals		0,68	0,72	0,78	0,83	0,78	0,21					
		-2,120	9,983	32,735	-20,668	-44,677	24,748					
		1,1239	24,9143	267,8907	106,7952	499,0051	153,1144					
s ²		1052,8436										
studentized residual		-0,08	0,36	1,14	-0,70	-1,56	1,66					
		0,08	0,36	1,14	0,70	1,56	1,66					
		1	1	1	1	1	1					
		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
slope		302,951	355,385	450,732	528,000	739,200	1232,000					
intercept		1058,43819	3,03									
r ²		254,65775										
		0,9929										
Standard Error												
		I	II	III	IV	V	VI					
nt [nmol]		1,200	1,200	1,200	1,200	1,200	1,200					
V _{lipid} [μl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900					
V _{buffer} [μl]		239,952	239,914	239,846	239,722	239,500	239,100					
c _{buffer}		3,962	3,378	2,664	2,275	1,627	0,978					
c _{lipid} [μM]		5235,167	4544,416	3635,532	2356,364	1620,779	1073,593					
logMA		3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0					
mean		3,1										
SE(logMA)		0,03										
max		3,1										
min		3,0										
logMA		3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0					

initial r2: 0,9929

skip outlier detection if r2 > outlier detection

check, if estimation of reference assay volume becomes worse after outlier detection

checking effect of outlier removal on intercept estimation of nt/c

lipid content	0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)	303,0	355,385	450,732	528,000	739,200	1232,000
	1058,43819	w/o outlier	with outlier			
	254,65775	14,658	14,658	0,00 ok		
	0,9929	improvement? no	1,0			
		accept outlier na				

abs(studentized residuals)

	0,08	0,36	1,14	0,70	1,56	1,66
	0,04762993	0,08573388	0,15432099	0,27777778	0,5	1,66
	303,0	355,4	450,7	528,0	739,2	

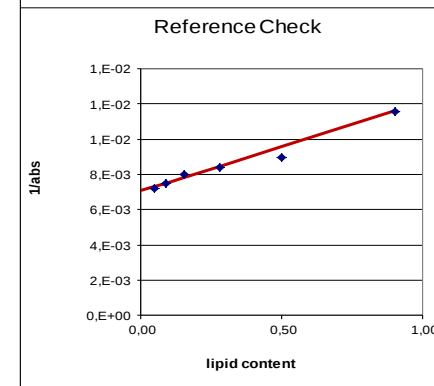
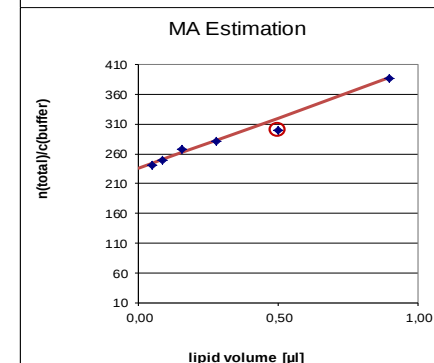
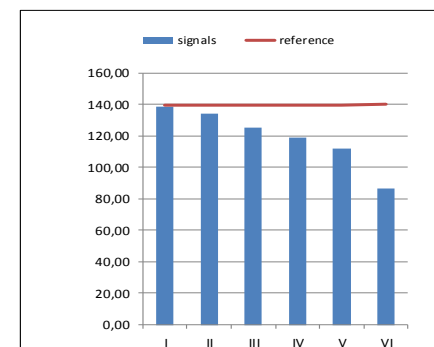
second tier r2: 0,9929

skip outlier detection if r2 > outlier detection

no outliers will be recorded if there are only 3 or less points left at step 1 or 2

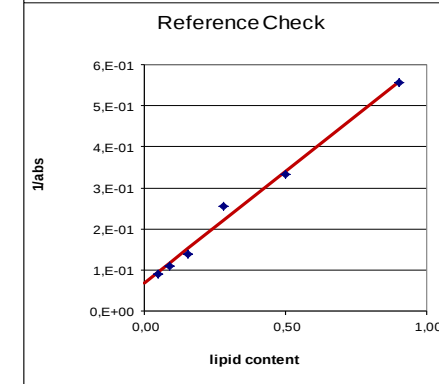
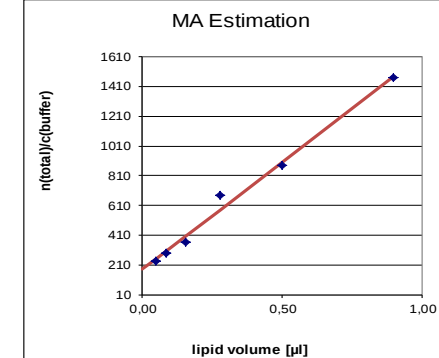
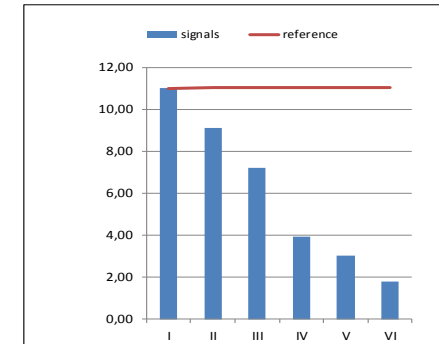
I	II	III	IV	V	VI
3,1	3,1	3,1	3,0	3,0	3,0

test article No 12 SL11						
		5,00 μ M				0 nm / amu
Ref 1	139,40	A	av ref ok			
Ref 2	139,10	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	139,25	139,25	139,25	139,25	139,25	139,25
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	139,28	139,30	139,34	139,41	139,54	139,77
Signal in TRANSIL wells:	138,50	134,00	124,90	118,80	111,70	86,30
						ok



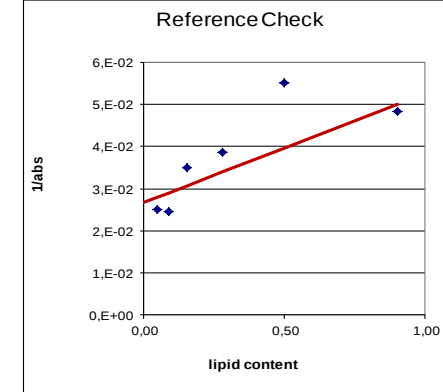
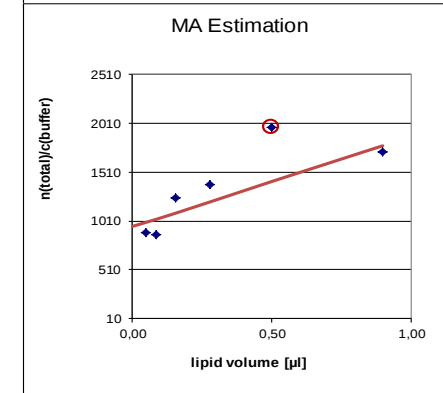
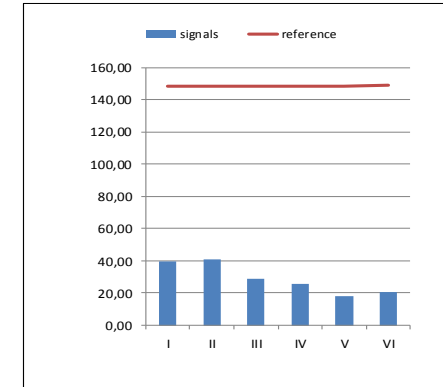
reg	2,23 $\pm$ 0,15	0,99700
avg	2,02 $\pm$ 0,15	
choice	2,23E+00 $\pm$ 0,15	1

test article No 13 SL12						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	4,00 R av ref too low					
Ref 2	4,00 ref diff ok max ref too low					
Signal Reference:	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00	11,00
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	11,00	11,00	11,01	11,01	11,02	11,04
Signal in TRANSIL wells:	11,00	9,10	7,20	3,90	3,00	1,80
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	reference	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	reference	ok	ok	ok	ok	ok
0,0						
QC index: 8,3 logMA: 3,16 ± 0,08 r²: 0,98964						
warning messages: poor reference quality: solubility problem?						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well		9,09E-02	1,10E-01	1,39E-01	2,56E-01	5,56E-01
nt [nmol]		1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]		5,00	4,14	3,27	1,77	1,36
n(total)/c(buffer)		240	290	367	677	880
binding		0%	17%	35%	65%	73%
Lipid concentration [µl/ml]:		0,20	0,36	0,64	1,16	2,08
Lipid concentration [µM]:		261	470	846	1523	2741
Molecular ratio lipid:total cmp		218	2	2	2	3
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)		261129027	2268	2041	1966	3141
saturation threshold		99,9%				
systematic outlier (saturation)		1	1	1	1	1
consistent saturation		1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)		1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency		1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		240,000	290,110	366,667	676,923	880,000
slope		1436,53393				
intercept		182,81877				
r²		0,9896				
prediction		251,241	305,978	404,506	581,856	901,086
residuals		-11,241	-15,869	-37,839	95,067	-21,086
standardized residuals		0,000	0,000	0,000	1,993	0,000
Threshold		1,5				
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
lipid content [µl]		0,048	0,086	0,154	0,278	0,500
n(total)/c(buffer)		240,000	290,110	366,667	676,923	880,000
slope		1436,53393	3,16			
intercept		182,81877				
r²		0,9896				
prediction	182,819	251,241	305,978	404,506	581,856	901,086
outlier						
binding QC						
log lipid		-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30
compound free		1,00	0,83	0,65	0,35	0,27
compound bound		0,00	0,17	0,35	0,65	0,73
valid log lipid		-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301
valid compound bound		0,000	0,173	0,345	0,645	0,727
slope		0,68783				
intercept		0,92498				
r²		0,9729				



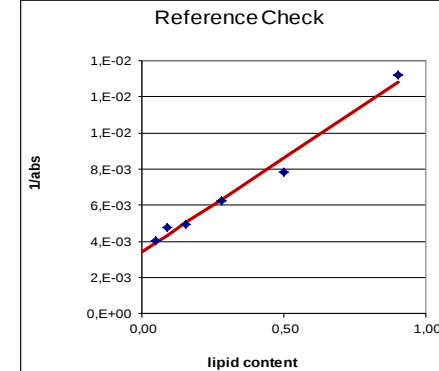
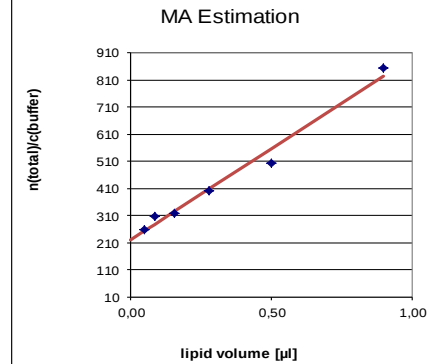
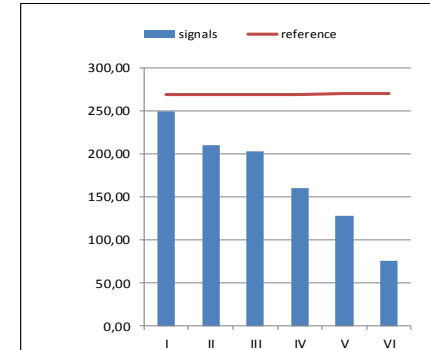
reg	3,16 ± 0,08	0,98964
avg	3,02 ± 0,08	
choice	3,16E+00 ± 0,08	1

test article No 14 SL13						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	135,20	A	av ref ok			
Ref 2	161,20	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	148,20	148,20	148,20	148,20	148,20	148,20
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	148,23	148,25	148,30	148,37	148,51	148,76
Signal in TRANSIL wells:	39,90	40,80	28,60	25,80	18,10	20,70
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	outlier	ok
0,0						
QC index: 7,4 logMA: 2,96 ± 0,15 r ² : 0,81783						
warning messages: poor intercept fit,						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well	2,51E-02	2,45E-02	3,50E-02	3,88E-02	5,52E-02	4,83E-02
nt [nmol]	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]	1,35	1,38	0,96	0,87	0,61	0,70
n(total)/c(buffer)	891	872	1244	1379	1965	1718
binding	73%	72%	81%	83%	88%	86%
Lipid concentration [µl/ml]:	0,20	0,36	0,64	1,16	2,08	3,75
Lipid concentration [µM]:	261	470	846	1523	2741	4934
Molecular ratio lipid:total cmp	218	1	1	1	1	3
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)	298	540	874	1537	2602	4779
saturation threshold	99,9%					
systematic outlier (saturation)	1	1	1	1	1	1
consistent saturation	1	1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)	1	1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency	1	1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]	0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)	891,429	871,765	1243,636	1378,605	1965,083	1718,261
slope	1097,08306					
intercept	985,41705					
r ²	0,6571					
prediction	1037,671	1079,474	1154,720	1290,162	1533,959	1972,792
residuals	-146,242	-207,710	88,916	88,442	431,124	-254,531
standardized residuals	0,000	0,000	0,346	0,344	1,676	0,000
Threshold	1,5					
statistical outlier	5	1	1	1	0	1
	0,048	0,086	0,154	0,278		0,900
	891,429	871,765	1243,636	1378,605		1718,261
slope	915,43616	2,96				
intercept	952,43154					
r ²	0,8178					
prediction	952,432	996,034	1030,915	1093,703	1206,719	1410,150
						1776,324
outlier						
lipid content [µl]					0,500	
n(total)/c(buffer)					1965,083	
binding QC						
log lipid	-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30	-0,05
compound free	0,27	0,28	0,19	0,17	0,12	0,14
compound bound	0,73	0,72	0,81	0,83	0,88	0,86
valid log lipid	-1,322	-1,067	-0,812	-0,556		-0,046
valid compound bound	0,731	0,725	0,807	0,826		0,860
slope	0,11406					
intercept	0,87648					
r ²	0,8775					



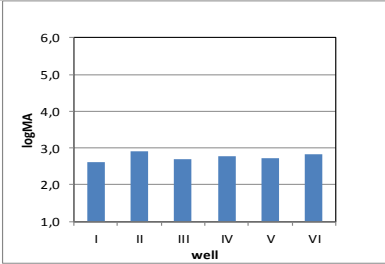
reg	2,96 ± 0,15	0,81783
avg	3,73 ± 0,15	
choice	2,96E+00 ± 0,15	1

test article No 15 Doxorubicin						
5,00 µM 0 nm / amu						
Ref 1	269,70	A	av ref ok			
Ref 2	267,80	ref diff ok	max ref ok			
Signal Reference:	268,75	268,75	268,75	268,75	268,75	268,75
TRANSIL well:	I	II	III	IV	V	VI
adjusted reference:	268,80	268,85	268,92	269,06	269,31	269,76
Signal in TRANSIL wells:	248,80	209,60	203,00	160,40	127,90	75,60
ok						
-						
missing values						
1 1 1 1 1						
outlier detection						
consistency	ok	ok	ok	ok	ok	ok
saturation	ok	ok	ok	ok	ok	ok
statistics	ok	ok	ok	ok	ok	ok
0,0						
QC index:	9,5	logMA:	2,83 ± 0,04	r ² :	0,98140	
warning messages:						
consistency check						
signal < reference	6	1	1	1	1	1
binding > 0%	1	1	1	1	1	1
steady increase in binding & summary	6	1	1	1	1	1
removal of outliers due to saturation						
lipid content	0	0,05	0,09	0,15	0,28	0,50
1/signal in TRANSIL well	4,02E-03	4,77E-03	4,93E-03	6,23E-03	7,82E-03	1,32E-02
nt [nmol]	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2
c(buffer)* [µmol/l]	4,63	3,90	3,78	2,98	2,38	1,41
n(total)/c(buffer)	259	308	318	402	504	853
binding	7%	22%	24%	40%	52%	72%
Lipid concentration [µl/ml]:	0,20	0,36	0,64	1,16	2,08	3,75
Lipid concentration [µM]:	261	470	846	1523	2741	4934
Molecular ratio lipid:total cmp	218	2	3	4	5	6
Molecular ratio lipid:cmp bound (mol_ratio)	2931	1780	2882	3148	4359	5721
saturation threshold	99,9%					
systematic outlier (saturation)	1	1	1	1	1	1
consistent saturation	1	1	1	1	1	1
bead level saturation (mol_ratio < 40)	1	1	1	1	1	1
valid lipid conc.						
valid c(lipid)/c(buffer) in well						
outlier due to saturation and consistency	1	1	1	1	1	1
statistical outlier detection & removal						
lipid content [µl]	0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
n(total)/c(buffer)	259,244	307,729	317,734	402,120	504,300	853,175
slope	670,63213					
intercept	221,03326					
r ²	0,9814					
prediction	252,975	278,529	324,526	407,320	556,349	824,602
residuals	6,269	29,200	-6,792	-5,200	-52,049	28,572
standardized residuals	0,209	0,974	0,000	0,000	0,000	0,953
Threshold	1,5					
statistical outlier	6	1	1	1	1	1
	0,048	0,086	0,154	0,278	0,500	0,900
	259,244	307,729	317,734	402,120	504,300	853,175
slope	670,63213	2,83				
intercept	221,03326					
r ²	0,9814					
prediction	221,033	252,975	278,529	324,526	407,320	556,349
outlier						
lipid content [µl]						
n(total)/c(buffer)						
binding QC						
log lipid	-1,32	-1,07	-0,81	-0,56	-0,30	-0,05
compound free	0,93	0,78	0,76	0,60	0,48	0,28
compound bound	0,07	0,22	0,24	0,40	0,52	0,72
valid log lipid	-1,322	-1,067	-0,812	-0,556	-0,301	-0,046
valid compound bound	0,074	0,220	0,245	0,403	0,524	0,719
slope	0,48048					
intercept	0,69277					
r ²	0,9683					

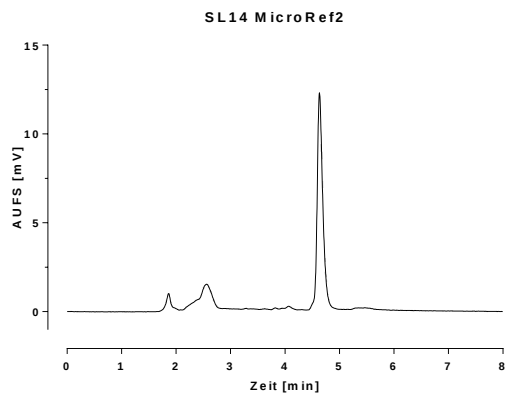
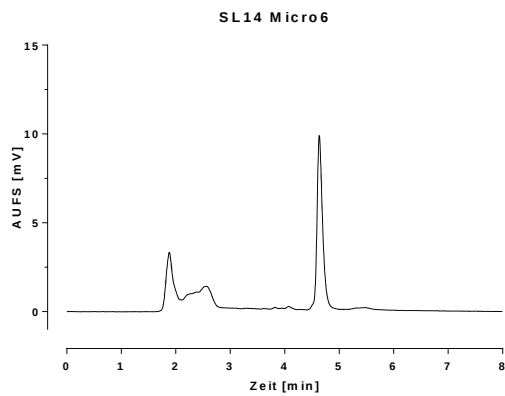
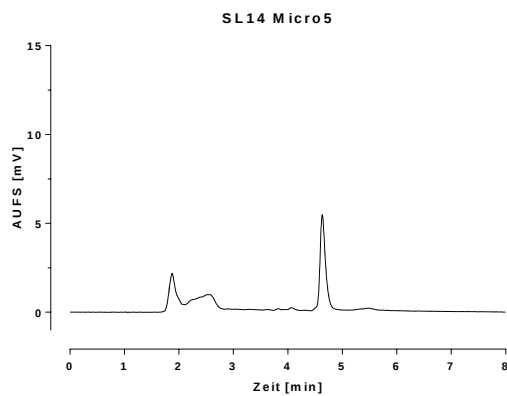
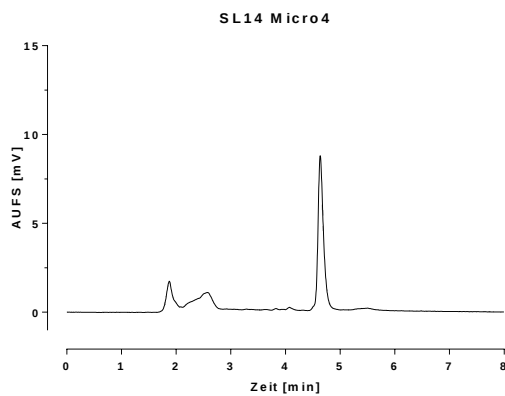
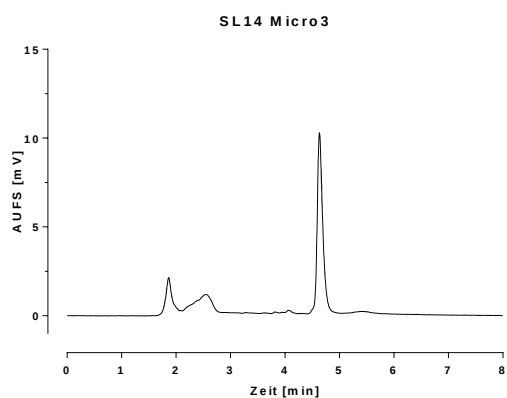
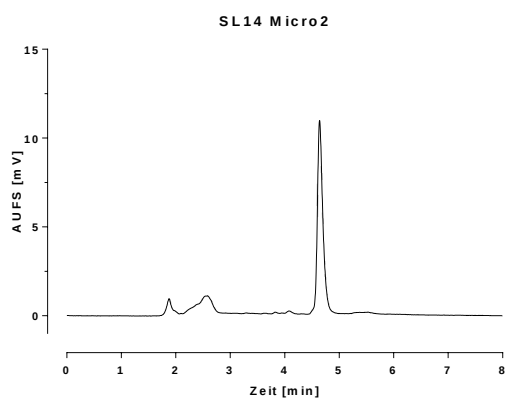
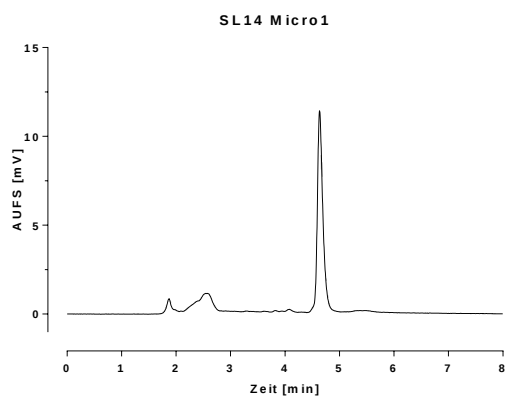
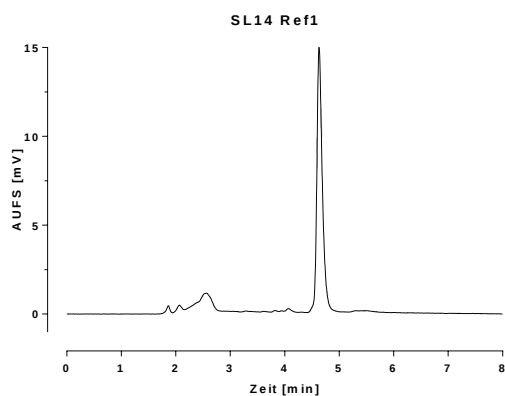


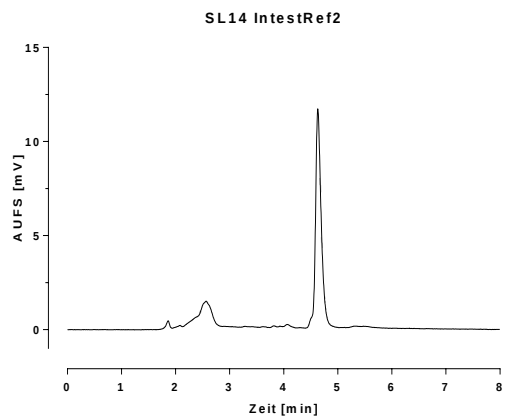
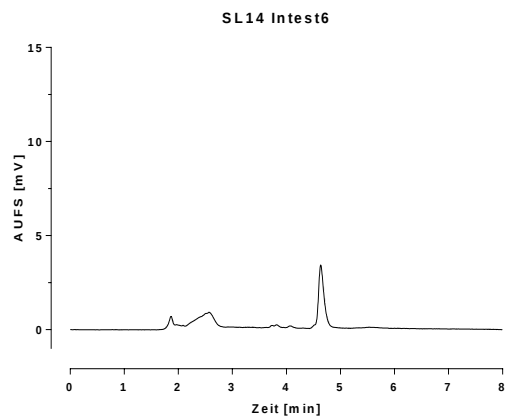
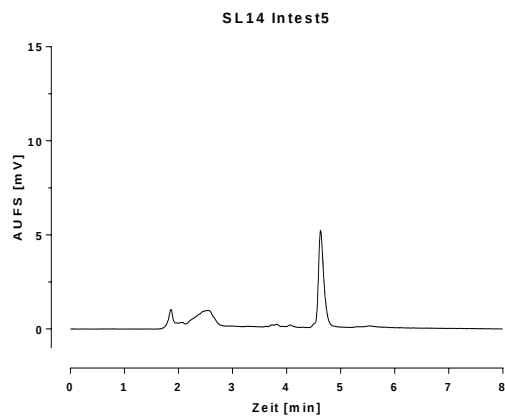
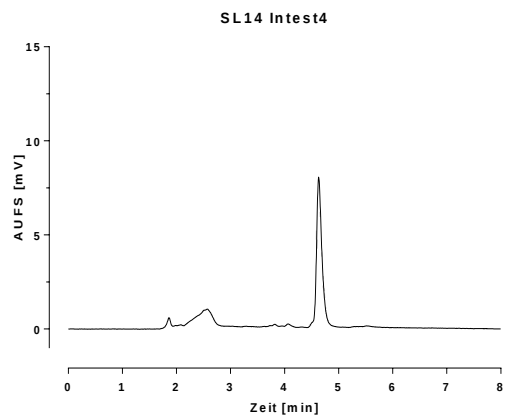
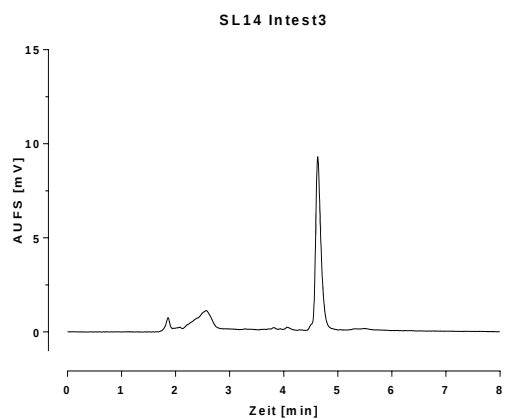
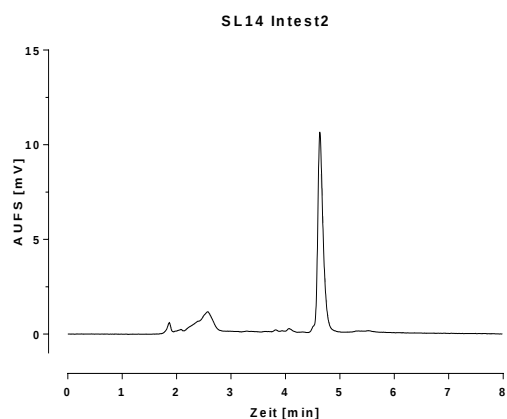
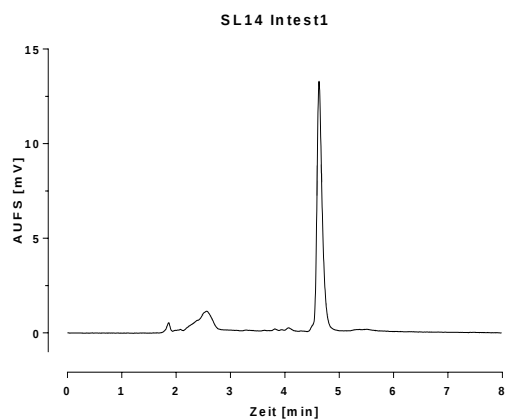
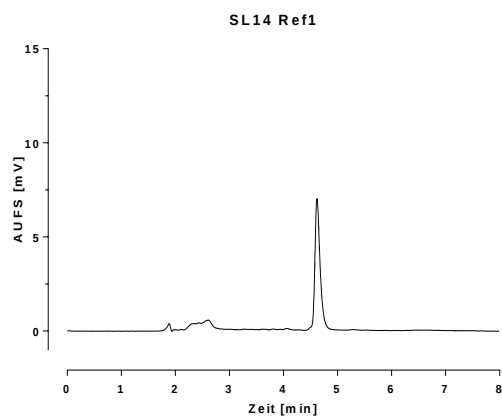
reg	2,83 ± 0,04	0,98140
avg	2,75 ± 0,04	1
choice	2,83E+00 ± 0,04	

lipid content 1/signal in TRANSIL well valid lipid content valid 1/signal slope intercept r² predicted 1/signal Predicted Reference Value Actual Reference Value Relative deviation 0 0,05 0,05 4,02E-03 0,01040 0,00343 0,9814 0 0,00 291,81 268,75 7,9% reference QC 0,09 4,77E-03 4,93E-03 6,23E-03 7,82E-03 1,32E-02 0,09 0,01 0,01 0,01 0,01											
no. data points 6 5 4 3 2 1 0 10 10 10 10 10 10 10 reference 20,0% 50,0% 100,0% 200,0% 500,0% <500% 10 9 8 7 5 3 r² MA predictic 0,9999 0,999 0,99 0,9 0,8 0,7 0,6 0,5 <0,5 7 7 6 5 4 3 ref. Treatment A M R slopes 1/abs > 0 mp bound > 0 id/c(buffer) >0 10 10 10 5 5 10 ref > signal 6 5 4 5 2 1 0 consistency 6 5 4 3 2 total Volume 0,92 10 10 10 10 10 10 warning messages data points reference ref. Treatment ref > signal consistency r² MA prediction slopes intercept											
mean x (x_i-mean(x))² Σ(x_i-mean(x))² residuals s² studentized residual slope intercept r² mean x (x_i-mean(x))² Σ(x_i-mean(x))² residuals s² studentized residual slope intercept r² 0,328 0,08 0,53 0,68 6,269 898,1190 1122,6487 0,23 0,23 1 0,048 259,244 670,63213 221,03326 0,9814 0,328 0,08 0,53 0,68 6,269 9,8249 1122,6487 0,23 0,23 1 0,048 259,244 670,63213 221,03326 0,9814 0,06 0,72 29,200 213,1579 1,03 0,086 307,729 #BEZUG! 1,03 0,72 29,200 213,1579 1,03 0,086 307,729 2,83 0,03 0,78 -6,792 11,5324 -0,23 0,154 317,734 0,03 0,78 -6,792 11,5324 -0,23 0,154 317,734 0,00 0,83 -5,200 6,7607 -0,17 0,278 402,120 0,00 0,83 -5,200 6,7607 -0,17 0,278 402,120 0,03 0,78 -52,049 677,2769 -1,76 0,500 504,300 0,03 0,78 -52,049 677,2769 -1,76 0,500 504,300 0,33 0,21 28,572 204,0959 1,86 0,900 853,175 0,33 0,21 28,572 204,0959 1,86 0,900 853,175											
initial r2: skip outlier detection if r2 > 0,9814 0,98 omit outlier detection check, if estimation of reference assay volume becomes worse after outlier detection checking effect of outlier removal on intercept estimation of nt/c 1 1 1 1 1 1 lipid content 0,048 0,086 0,154 0,278 0,500 0,900 n(total)/c(buffer) 259,2 307,729 317,734 402,120 504,300 853,175 670,63213 221,03326 0,9814 improvement?no 18,967 18,967 0,00 ok 1,0 accept outlier na abs(studentized residuals) 0,23 1,03 0,23 0,17 1,76 1,86 1,86 0,04762993 0,08573388 0,15432099 0,27777778 0,5 259,2 307,7 317,7 402,1 504,3 second tier r2: skip outlier detection if r2 > 0,9814 0,98 omit outlier detection no outliers will be recorded if there are only 3 or less points left at step 1 or 2											
Standard Error I II III IV V VI 1 1 1 1 1 1 nt [nmol] 1,200 1,200 1,200 1,200 1,200 1,200 V_lipid [μl] 0,048 0,086 0,154 0,278 0,500 0,900 V_buffer [μl] 239,952 239,914 239,846 239,722 239,500 239,100 c_buffer 4,630 3,901 3,779 2,988 2,385 1,412 c_lipid [μM] 1870,233 3080,598 1902,407 1741,663 1257,823 958,264 logMA 2,6 2,9 2,7 2,8 2,7 2,8 mean 2,8 SE(logMA) 0,04 max 2,9 min 2,6 logMA 2,6 2,9 2,7 2,8 2,7 2,8											
logMA I II III IV V VI 2,6 2,9 2,7 2,8 2,7 2,8											



4.3.4 Chromatogramme von SL14 als Beispiel





Anhand der Chromatogramme von SL14 wird der Zusammenhang zwischen Peakfläche und Lipidgehalt noch einmal verdeutlicht. Die Peakflächen nehmen von Reaktionskammer 1 bis 6 (Micro 1-6 bzw. Intest1-6) kontinuierlich ab und sind kleiner als die der Referenzen. Referenz 1 bei Intest ist ein Ausreißer.

5. Zusammenfassung

Tabelle: Übersicht der Ergebnisse

	MG	logMA _{mic}	fu _{mic} %	TQI _{mic}	logMA _{int}	TQI _{int}	P _{int} [10 ⁻⁶ cm/sec]	fu _{plasma} %	Vd [L/kg]
SL5	268	2,63	88,9	3,7	2,64	7,4	19,0		
SL4	359	2,51	91,4	8,2	3,24	7,3	16,9	1,5	1,75
SL3	395	3,26	65,4	6,4	3,15	6,5	13,7	9,3	3,00
SL1	240	2,58*	90,0	4,9	2,52	7,0	21,0		
SL2	242	2,13*	96,3	8,7	2,22	8,3	16,6	6,4	0,85
SL6	282	2,81*	84,4	8,9	2,83	9,6	19,5	5,7	1,70
SL7	404	2,84	83,4	8,4	2,54	9,5	6,26	3,0	0,95
SL14	418	2,54	90,8	7,7	2,87	8,6	9,12	3,9	1,56
SL8	376	3,09	73,8	6,1	2,65	9,3	9,17	4,2	1,23
SL9	420	2,72	86,8	7,7	2,84	9,5	8,63	6,9	1,85
SL10	382	3,03	76,5	9,5	3,03	9,7	13,2	2,2	1,54
SL11	395	2,29*	94,7	8,6	2,23	9,6	3,96	9,2	0,98
SL12	270	3,14	71,3	7,4	3,16	8,3	23,2	12,2	3,35
SL13	703	3,90	30,2	7,4	2,96	7,4	1,83	0,2	0,60
Doxo	580	2,63	88,9	8,7	2,83	9,5	3,38	35,3	3,58

*Microsomal Binding Kit – low affinity compounds

logMA _{mic} < 3 & fu _{mic} > 80%
logMA _{mic} > 3 & fu _{mic} < 80%
logMA _{int} < 3
logMA _{int} > 3
P _{int} [10 ⁻⁶ cm/sec] < 10
P _{int} [10 ⁻⁶ cm/sec] > 10
Vd [L/kg] < 1,50
Vd [L/kg] > 1,50
TQI < 5 mangelhafte Qualität

In der vorliegenden Diplomarbeit wurden Untersuchungen zur Gewebsbindung neuer antibiotisch aktiver Anthrachinonderivate durchgeführt. Mithilfe des Transil^{XL} Microsomal Binding Kit und Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit wurde die Bindung an mikrosomale sowie an intestinale Membranen bestimmt. Darüber hinaus konnte aus den gewonnenen Ergebnissen und durch Heranziehen von Daten zur Plasmaproteinbindung, auch das

scheinbare Verteilungsvolumen der Substanzen berechnet werden. Doxorubicin diene als Standard, der Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur zeigt eine Übereinstimmung mit der Plasmaproteinbindung, jedoch eine Abweichung des Verteilungsvolumens, das laut Literatur bei 25 L/kg liegt [Fachinformation Doxorubicin 2014]. Eine Ursache hierfür ist, dass es im Transil-System zu keiner Metabolisierung kommt, in-vivo Doxorubicin aber sehr rasch metabolisiert wird. Doxorubicin hat eine starke Gewebsbindung, dies wird aber durch die Ergebnisse des Transil Kits nicht deutlich. Um genauere Aussagen treffen zu können, wäre eine Wiederholung des Tests angebracht.

Die Qualität Indices der Bestimmungen sind, abgesehen von TQI_{mic} bei SL1 und SL5, durchwegs in einem sehr hohen Bereich. Die mangelnde Qualität der Ergebnisse von SL1 und SL5 ist auf die rasche Instabilität und geringe Löslichkeit der beiden Substanzen zurückzuführen. Aufgrund mangelnder Löslichkeit waren die Tests zur Proteinbindung¹ bei SL1 und SL5 nicht erfolgreich, deshalb konnte aufgrund der fehlenden K_d -Werte¹ auch kein Verteilungsvolumen ermittelt werden.

Der überwiegende Anteil der Sealife-Verbindungen kennzeichnet sich durch eine niedrige Bindungsrate an Lebermikrosomen, vier Testverbindungen erforderten sogar den Transil^{XL} Microsomal Binding Kit – low affinity compounds, bei dem ein höherer Lipidgehalt in den Reaktionskammern angeboten wird. Diese niedrige Bindungsrate bedingt eine intensive Metabolisierung. Auffallend ist jedoch die Verbindung SL13, die stark an die mikrosomale Membran bindet und den CYP Enzymen nicht frei zur Metabolisierung zur Verfügung steht. Wegen der mangelnden Löslichkeit wurde hier mit einer höheren DMSO-Konzentration (60%) gearbeitet, dies kann zu einer Unterschätzung der Bindungsrate führen. Womöglich ist von SL13 eine noch stärkere Bindung an die Membran der Lebermikrosomen zu erwarten.

Die höchste Affinität zu intestinalen Membranen zeigen die Verbindungen SL3, SL4, SL10 und SL12, die geringste SL2 und SL11, letztere haben auch eine ähnlich niedrige Affinität zu den Lebermikrosomen.

Alle Verbindungen haben aufgrund ihrer ausgeprägten Lipophilie eine gute Bioverfügbarkeit, die sich in den hohen Permeabilitätskoeffizienten widerspiegelt. Beim Großteil der Substanzen beträgt P_{int} über $10 \cdot 10^{-6}$ cm/sec oder liegt knapp darunter, was eine Bioverfügbarkeit von über 90% bedeutet.

Das Verteilungsvolumen der neuen Anthrachinonderivate ist, ausgenommen der Verbindung SL13, relativ hoch, besonders bei SL3 und SL12. Diese Gegebenheit wird im

Hinblick auf die Dosierung zu Schwierigkeiten führen, da bei hohen Verteilungsvolumina hohe Dosen notwendig sind um die MIC zu erreichen und somit die Gefahr besteht toxische Plasmakonzentrationen zu erreichen.

SL13 hat wegen seines hohen Molekulargewichtes und hoher Plasmaproteinbindung - der freie Anteil im Plasma beträgt nur 0,2 % - ein geringes scheinbares Verteilungsvolumen. Interessant ist, dass hier trotz der offensichtlich starken Lipophilie, der Permeabilitätskoeffizient, im Vergleich zu den übrigen Verbindungen, gering ist. Dieser Umstand lässt sich wohl auf das hohe Molekulargewicht zurückführen.

¹von Sagaischek Katharina im Rahmen ihrer Diplomarbeit ermittelt

6. Summary

In this diploma thesis, the binding of anthraquinone derivatives to tissue has been investigated. The tested compounds are new anthraquinone derivatives with antibiotic activity. The in-vitro system used in the experiment were the so-called test assays Transil^{XL} Microsomal Binding Kit and Transil^{XL} Intestinal Absorption Kit which allow the examination of the binding rate to liver microsomes and intestinal membranes. In addition the data of membrane affinity obtained from the test and plasma protein binding¹ data were used for calculating the apparent volume of distribution. For quantification purposes, HPLC was method of choice.

Doxorubicin, an established chemotherapeutic drug, was a standard and the results from the Transil assays compared to the literature showed an identical plasma protein binding rate, but a great difference concerning the volume of distribution which should be about 25 l/kg [Fachinformation Doxorubicin 2014]. A reason for this deviation could be the rapid metabolism in-vivo which is missing in the Transil plates. Despite the fact that Doxorubicin binds strongly to tissues, the membrane affinity that has been found with the Transil kit is considerably low. For more reliable statements a repetition of the test would be applied.

The quality index which evaluates the test results is in a very high range, except for compound SL1 and SL5. Poor data quality with SL1 and SL5 may be due to rapid instability and poor solubility of both substances. Because of this poor solubility the plasma protein binding tests¹ were not successful, neither k_{dHSA}^1 nor k_{dAGP}^1 could be determined and so no volume of distribution could be calculated.

The majority of the SeaLife compounds are characterized by low liver microsomal binding rates, four compounds even needed the Transil^{XL} Microsomal Binding Kit-for low affinity compounds which contains a higher lipid concentration. Low microsomal binding causes strong metabolism by the CYP enzymes located mainly in the liver microsomes. Remarkably the compound SL13 shows a high microsomal binding rate and consequently cannot interact freely with the CYP enzymes. Due to poor solubility, a higher DMSO concentration (60% instead of 32%) was used, but this higher concentration of the solvent can lead to an underestimation of the binding rate. It is therefore possible that SL13 even shows a stronger binding to the microsomal membran than has been found in the experiment.

Concerning the intestinal absorption, anthraquinone derivatives SL3, SL4, SL10 and SL12 have the highest affinity to intestinal membranes, while SL2 and SL11 have the lowest affinity. Both show a comparably low affinity to the microsomal membran.

All compounds have a good bioavailability due to their high lipophilicity which is reflected in the high permeability coefficients. Most of the substances have a P_{int} above $10 \cdot 10^{-6}$ cm/sec] or just below, indicating a bioavailability of over 90%.

The volume of distribution of these new anthraquinones is except for compound SL13, relatively high, especially that one of SL3 and SL12. This will lead to problems finding a suitable dosage, because when the volume of distribution is high, the dose needed for reaching the minimal inhibiting concentration is also high and therefore the risk of causing toxic plasma concentrations is increased.

SL13 has a high molecular weight and strongly binds to plasma proteins, the amount freely available in the plasma is only 0,2 %. The consequence is a low apparent volume of distribution. It is interesting to note that despite of its strong lipophilicity SL13 has a low permeability coefficient when compared to the other compounds. This is most likely due to its high molecular weight.

The tested anthraquinone derivatives are regarded as a problematic substance class, not only because of their phamacokinetics but also because of their physicochemical properties – they are photosensitive and often have an inadequate solubility in DMSO.

¹data has been taken from Sagaischek Katharina, who has worked on this topic in the context of her diploma thesis

7. Conclusio

Der Vorhersage der Pharmakokinetik einer Substanz kommt in der Forschung eine große Bedeutung zu. Nur etwa 10% der Arzneistoffkandidaten schaffen den Eintritt in klinische Studien. Bei 40% der Arzneistoffkandidaten kommt es wegen ungünstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zum Abbruch der Forschung [Obach 1997]. Die Anwendung zuverlässiger Methoden zur Vorhersage der Pharmakokinetik aus präklinischen und in-vitro Daten kann die große Anzahl an Arzneistoffkandidaten, die getestet werden müssen, bis einige wenige für weitere Untersuchungen ausgewählt werden können, minimieren. Vereint man die Ergebnisse der Transil Kits zur mikrosomalen und intestinalen Bindung mit den Daten zur Plasmaproteinbindung einer Substanz, lässt sich die Pharmakokinetik der Substanz im menschlichen Körper voraussagen. Wirkstoffe, die sich aufgrund ihrer Eigenschaften nie als Arzneistoff etablieren würden, können so in einem frühen Stadium der Forschung erkannt und ausgeschlossen werden. Das bringt nicht nur einen Kostenvorteil sondern auch Zeitersparnis.

Eine exakte Übertragung der Ergebnisse aus in-vitro Untersuchungen auf den Menschen ist aufgrund der komplexen Individualität jedoch nicht möglich. Parameter wie das Verteilungsvolumen werden durch individuelle Eigenschaften oder eine veränderte Stoffwechsellage, welche bei Krankheiten auftreten kann, maßgeblich beeinflusst.

Bei den getesteten Anthrachinonderivaten handelt es sich sowohl was deren pharmakokinetische Eigenschaften betrifft als auch wegen ihrer physikochemischen Eigenschaften um eine problematische Substanzklasse. Die Verbindungen charakterisieren sich durch eine hohe Lipophilie, folglich durch eine hohe Plasmaproteinbindung und hohe Verteilungsvolumina. Überdies sind sie aufgrund ihrer Struktur photosensibel und oft in DMSO unzureichend löslich.

8. Literatur

Aktories, K.; Förstermann, U.; Hofmann, F.; Starke, K.; (2005) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. *Elsevir, Urban & Fischer Verlag*, 9. Auflage

Aly, A. H.; Edrada-Ebel, R.; Wray, V.; Müller, W. E.; Kozytska, S.; Hentschel, U.; Proksch, P.; Ebel, R.; (2008) Bioactive metabolites from the endophytic fungus *Ampelomyces* sp. isolated from the medicinal plant *Urospermum picroides*. *Phytochemistry* 69(8):1716-25.

Austin, R. P.; Barton, P.; Cockroft S. L.; Wenlock M. C.; Riley, R. J.; (2002) The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metab Dispos.* 30(12):1497-503.

DiPiro, J. T.; (2010) Concepts in Clinical Pharmacokinetics, Fifth Edition. *American Society of Health-System Pharmacists*

Dubravko, D.; (2004) Statistik mit R: Einführung für Wirtschafts- und Sozialwissenschaftler. *Oldenburg Verlag*

EP 2435394 B1: Neue Anthrachinon-Derivate; Pretsch, A.; Proksch, P.; Debbab, A.;
Patentinhaber: Sealife Pharma GmbH, Anmeldetag 31. 05.2010
<https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/20130508/patents/EP2435394NWB1/document.pdf>, letzter Aufruf 8. 05. 2014

Fachinformation Doxorubicin (2014)
https://aspreregister.basg.gv.at/aspreregister/faces/aspreregister.jspx?_afrLoop=7986460514066678&_afrWindowMode=0&_adf.ctrl-state=niwmjp6nl_4

Freissmuth, M.; Offermanns, S.; Böhm, S.; (2012) Pharmakologie und Toxikologie. *Springer Medizin Verlag Heidelberg* 1. Auflage

Galeazzi, R. L.; Gysling, E.; (1997) Verteilungsvolumen und Clearance. *Pharma-kritik Jahrgang 18*, Nr. 11, PK 426

Hallifax, D.; Houston, J. B.; (2006) Binding of drugs to hepatic microsomes: comment and assessment of current prediction methodology with recommendation for improvement. *Drug Metab Dispos.* 34(4):724-6; author reply 727

Huang, C.; J.-H.; Chen, B.; Yu, M.; Huang, H.-B.; Zhu, X.; Lu, Y.-J.; She, Z.-G.; Lin, Y.-C.; (2011) . *Mar Drugs.* 9(5): 832–843.

Huang, C.; Jin, H.; Song, B.; Zhu, X.; Zhao, H.; Cai, J.; Lu, Y.; Chen, B.; Lin, Y.; (2012) The cytotoxicity and anticancer mechanisms of alterporriol L, a marine bianthraquinone, against MCF-7 human breast cancer cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* 93(2):777-85.

Kück, U.; Nowrousian, M.; Hoff, B.; Engh, I.; (2009) Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung. *Springer Verlag Berlin Heidelberg* 3. Auflage

Longo, V.; Amato, G.; Salvetti, A.; Gervasi, P. G.; (2000) Heterogenous effects of anthraquinones on drug-metabolizing enzymes in the liver and small intestine of the rat.

McLure, J. A.; Miners, J. O.; Birkett, D. J.; **(2000)** Nonspecific binding of drugs to human liver microsomes. *Br J Clin Pharmacol*. 49(5):453-61.

Obach, R. S.; Baxter, J. G.; Liston, Th. E.; Silber, B. M.; Jones, B. C.; Macintyre, F.; Rance, D. J.; Wastall, Ph.;

(1997) The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(1):46-58.

Obach, R. S.; **(1999)** Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos*. 27(11):1350-1359

Ondeyka, J.; Buevich, A. V.; Williamson, R. T.; Zink, D. L.; Polishook, J. D.; Occi, J.; Vicente, F.; Basilio, A.; Bills, G. F.; Donald, R. G. K.; Phillips, J. W.; Goetz, M. A.; Singh, S. B.; **(2014)** Isolation, Structure Elucidation, and Biological Activity of Altersolanol P Using Staphylococcus aureus Fitness Test Based Genome-Wide Screening. *J Nat Prod*. 77, 497-502

<http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Anthranoide> **(2014)**, letzter Aufruf: 17. 04. 2014

Möller, H.; Potthast, H.; **(1999)** Biopharmazeutische Charakterisierung von Arzneistoffen und Fertigarzneimitteln. *Pharmazeutische Zeitung online* Ausgabe 20, GOVI Verlag
http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=pharm5_20_1999, letzter Aufruf: 03. 05. 2014

Plattner, H.; Hentschel, J.; **(2011)** Zellbiologie. *Thieme Verlag*, 4. Auflage

Pompeng, P.; Sommit, D.; Sriubolmas, N.; Ngamrojanavanich, N.; Matsubara, K.; Pudhom, K.; **(2013)** Antiangiogenic effects of anthranoids from *Alternaria* sp., an endophytic fungus in a Thai medicinal plant *Erythrina variegata*. *Phytomedicine*, 20(10):918-22

Richter-Kuhlmann, E.; **(2014)** Antibiotikatherapie: Häufig zu viel, zu lang und zu breit. *Dtsch Ärztebl*, 111 (S): A-172/B-152/C-146

Sagaischek, K.; **(2014)** Diplomarbeit: Charakterisierung der Bindungskinetik von Anthrachinonen an verschiedenen Plasmaproteinfraktionen.

Teiten, M.-H.; Mack, F.; Debbab, A.; Aly, A. H.; Dicato, M.; Proksch, P.; Diederich, M.; **(2013)** Anticancer effect of altersolanol A, a metabolite produced by the endophytic fungus *Stemphylium globuliferum*, mediated by its pro-apoptotic and anti-invasive potential via the inhibition of NF- κ B activity. *Bioorg Med Chem*. 21(13):3850-8

User Guide TransilXL Intestinal Absorption Kit (2012) TMP-0100-2096/TMP-0100-2196, Version 2, Sovicell GmbH, Deutschland

User Guide TransilXL Microsomal Binding Kit (2012) TMP-0120-2096, Version 2, Sovicell GmbH, Deutschland

Wagner, H.; unter Mitarbeit von Bauer, R.; (1999) Pharmazeutische Biologie, Bd.2, Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. *Wiss, Verl.-Ges.* Auflage 6

Wehling, M.; (2011) Klinische Pharmakologie. *Georg Thieme Verlag KG*, 2. Auflage

Welsch, N.; Liebmann, C. Ch.; (2004) Farben: Natur, Technik, Kunst. *Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag*, 2. Auflage

Willmann, St.; Schmitt, W.; Keldenich, J.; Lippert, J.; Dressman, J. B.; (2004) A Physiological Model for the Estimation of the Fraction Dose Absorbed in Humans. *J Med Chem* 47(16):4022-31

Zheng, C. J.; Shao, C. L.; Guo, Z. Y.; Chen, J. F.; Deng, D. S.; Yang, K. L.; Chen, Y. Y.; Fu, X. M.; She, Z. G.; Lin, Y. C.; Wang, C. Y.; (2012) Bioactive hydroanthraquinones and anthraquinone dimers from a soft coral-derived *Alternaria* sp. fungus. *J Nat Prod.* 75(2):189-97.

9. Anhang

9.1 Raw data

9.1.1 Microsomal Binding

Please enter the peak area or concentration data in column G below

Please leave missing data fields blank

test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
SL5	A-1	Ref 1	2,2		
SL5	B-1	Well 1	1,6		
SL5	C-1	Well 2	2,9		
SL5	D-1	Well 3	3,1		
SL5	E-1	Well 4	1,8		
SL5	F-1	Well 5	4,1		
SL5	G-1	Well 6	6,7		
SL5	H-1	Ref 2	2		
SL4	A-2	Ref 1	3,1		
SL4	B-2	Well 1	3		
SL4	C-2	Well 2	2,8		
SL4	D-2	Well 3	3		
SL4	E-2	Well 4	2,3		
SL4	F-2	Well 5	1,8		
SL4	G-2	Well 6	3,4		
SL4	H-2	Ref 2	2,5		
SL3	A-3	Ref 1	2,7		
SL3	B-3	Well 1	1,4		
SL3	C-3	Well 2	1,3		
SL3	D-3	Well 3	1,2		
SL3	E-3	Well 4	0,7		
SL3	F-3	Well 5			
SL3	G-3	Well 6			
SL3	H-3	Ref 2	1,4		
SL7	A-7	Ref 1	7,4		
SL7	B-7	Well 1	5,6		
SL7	C-7	Well 2	4,3		
SL7	D-7	Well 3	3,3		
SL7	E-7	Well 4	3,1		
SL7	F-7	Well 5	2,7		
SL7	G-7	Well 6	1,7		
SL7	H-7	Ref 2	4		
SL14	A-8	Ref 1	102,3		
SL14	B-8	Well 1	78,5		
SL14	C-8	Well 2	75,4		
SL14	D-8	Well 3	70,2		
SL14	E-8	Well 4	60,1		
SL14	F-8	Well 5	37,1		
SL14	G-8	Well 6	67,4		
SL14	H-8	Ref 2	86,2		
SL8	A-9	Ref 1	35,9		
SL8	B-9	Well 1	19,4		
SL8	C-9	Well 2	18,4		
SL8	D-9	Well 3	19,7		
SL8	E-9	Well 4	13,8		
SL8	F-9	Well 5	10,1		
SL8	G-9	Well 6	19,2		
SL8	H-9	Ref 2	54		
SL9	A-10	Ref 1	92,9		
SL9	B-10	Well 1	79,3		
SL9	C-10	Well 2	79,8		
SL9	D-10	Well 3	60,2		
SL9	E-10	Well 4	55,4		
SL9	F-10	Well 5	66,5		
SL9	G-10	Well 6	82,3		
SL9	H-10	Ref 2	92,5		
SL10	A-11	Ref 1	6,4		
SL10	B-11	Well 1	4,3		
SL10	C-11	Well 2	5		
SL10	D-11	Well 3	3,2		
SL10	E-11	Well 4	2,2		
SL10	F-11	Well 5	1,6		
SL10	G-11	Well 6	1,1		
SL10	H-11	Ref 2	5,4		

test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
SL12	A-1	Ref 1	4,4		
SL12	B-1	Well 1	3		
SL12	C-1	Well 2	7,3		
SL12	D-1	Well 3	6,1		
SL12	E-1	Well 4	1,7		
SL12	F-1	Well 5	0,8		
SL12	G-1	Well 6	0,6		
SL12	H-1	Ref 2	3,4		
SL13	A-2	Ref 1	160,7		
SL13	B-2	Well 1	25,8		
SL13	C-2	Well 2	8,4		
SL13	D-2	Well 3	6,1		
SL13	E-2	Well 4	6,2		
SL13	F-2	Well 5	4,6		
SL13	G-2	Well 6	3,3		
SL13	H-2	Ref 2	164		
Doxorubicin	A-4	Ref 1	275,4		
Doxorubicin	B-4	Well 1	245,1		
Doxorubicin	C-4	Well 2	237,3		
Doxorubicin	D-4	Well 3	208,5		
Doxorubicin	E-4	Well 4	188,6		
Doxorubicin	F-4	Well 5	138,6		
Doxorubicin	G-4	Well 6	260		
Doxorubicin	H-4	Ref 2	301,5		

Ref1	Lipid content						Ref2
1	2	3	4	5	6	7	8
0.00 µl	0.05 µl	0.10 µl	0.17 µl	0.31 µl	0.56 µl	1.00 µl	0.00 µl

9.1.2 Microsomal Low Binding

test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
SL1	A-1	Ref 1	19,6		
SL1	B-1	Well 1	20,8		
SL1	C-1	Well 2	23,1		
SL1	D-1	Well 3	32,4		
SL1	E-1	Well 4	12		
SL1	F-1	Well 5	8		
SL1	G-1	Well 6	24,1		
SL1	H-1	Ref 2	19,4		
SL2	A-2	Ref 1	14		
SL2	B-2	Well 1	13		
SL2	C-2	Well 2	13,4		
SL2	D-2	Well 3	11,7		
SL2	E-2	Well 4	11,1		
SL2	F-2	Well 5	21		
SL2	G-2	Well 6	6,9		
SL2	H-2	Ref 2	16		
SL6	A-3	Ref 1	69		
SL6	B-3	Well 1	55,3		
SL6	C-3	Well 2	50,9		
SL6	D-3	Well 3	40,6		
SL6	E-3	Well 4	55,7		
SL6	F-3	Well 5	20		
SL6	G-3	Well 6	12,2		
SL6	H-3	Ref 2	87,4		
SL11	A-4	Ref 1	132,3		
SL11	B-4	Well 1	120,9		
SL11	C-4	Well 2	120,2		
SL11	D-4	Well 3	104,8		
SL11	E-4	Well 4	126		
SL11	F-4	Well 5	85,5		
SL11	G-4	Well 6	50,6		
SL11	H-4	Ref 2	128,5		

Ref1	Lipid content						Ref2
1	2	3	4	5	6	7	8
0.00 µl	0.11 µl	0.19 µl	0.34 µl	0.62 µl	1.11 µl	2.00 µl	0.00 µl

9.1.3 Intestinal Absorption

test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
SL5	A-1	Ref 1	2,2		
SL5	B-1	Well 1	6,4		
SL5	C-1	Well 2	3,2		
SL5	D-1	Well 3	2,6		
SL5	E-1	Well 4	2,8		
SL5	F-1	Well 5	2,1		
SL5	G-1	Well 6	1,8		
SL5	H-1	Ref 2	1,6		
SL4	A-2	Ref 1	2,5		
SL4	B-2	Well 1	2,6		
SL4	C-2	Well 2	1,8		
SL4	D-2	Well 3	1,75		
SL4	E-2	Well 4	1,1		
SL4	F-2	Well 5	0,6		
SL4	G-2	Well 6			
SL4	H-2	Ref 2	2,1		
SL3	A-3	Ref 1	1,9		
SL3	B-3	Well 1	1,6		
SL3	C-3	Well 2	1,7		
SL3	D-3	Well 3	1		
SL3	E-3	Well 4	0,75		
SL3	F-3	Well 5			
SL3	G-3	Well 6			
SL3	H-3	Ref 2	1,6		
SL1	A-4	Ref 1	20,8		
SL1	B-4	Well 1	28,4		
SL1	C-4	Well 2			
SL1	D-4	Well 3	16,8		
SL1	E-4	Well 4	16,4		
SL1	F-4	Well 5	14		
SL1	G-4	Well 6	10,6		
SL1	H-4	Ref 2	19,1		
SL2	A-5	Ref 1	15,6		
SL2	B-5	Well 1	13,5		
SL2	C-5	Well 2	12,5		
SL2	D-5	Well 3	16,2		
SL2	E-5	Well 4	13,4		
SL2	F-5	Well 5	11		
SL2	G-5	Well 6	8,6		
SL2	H-5	Ref 2	13,4		
SL6	A-6	Ref 1	70,6		
SL6	B-6	Well 1	56,2		
SL6	C-6	Well 2	55,2		
SL6	D-6	Well 3	50		
SL6	E-6	Well 4	41,5		
SL6	F-6	Well 5	35		
SL6	G-6	Well 6	19		
SL6	H-6	Ref 2	63,9		
SL7	A-7	Ref 1	4,1		
SL7	B-7	Well 1	4		
SL7	C-7	Well 2	4,1		
SL7	D-7	Well 3	3		
SL7	E-7	Well 4	2,7		
SL7	F-7	Well 5	2,4		
SL7	G-7	Well 6	1,8		
SL7	H-7	Ref 2	4,1		
SL14	A-8	Ref 1	45,9		
SL14	B-8	Well 1	87,9		
SL14	C-8	Well 2	72,8		
SL14	D-8	Well 3	62,3		
SL14	E-8	Well 4	54,5		
SL14	F-8	Well 5	35,3		
SL14	G-8	Well 6	23,9		
SL14	H-8	Ref 2	82,8		
SL8	A-9	Ref 1	34,9		
SL8	B-9	Well 1	47,4		
SL8	C-9	Well 2	44,5		
SL8	D-9	Well 3	41		
SL8	E-9	Well 4	33,8		
SL8	F-9	Well 5	23,8		
SL8	G-9	Well 6	18,7		
SL8	H-9	Ref 2	33,2		

SL9	A-10	Ref 1	118,3		
SL9	B-10	Well 1	92		
SL9	C-10	Well 2	74,9		
SL9	D-10	Well 3	84,8		
SL9	E-10	Well 4	66,5		
SL9	F-10	Well 5	42		
SL9	G-10	Well 6	31,2		
SL9	H-10	Ref 2	108,5		
SL10	A-11	Ref 1	6,6		
SL10	B-11	Well 1	6,1		
SL10	C-11	Well 2	5,2		
SL10	D-11	Well 3	4,1		
SL10	E-11	Well 4	3,5		
SL10	F-11	Well 5	2,5		
SL10	G-11	Well 6	1,5		
SL10	H-11	Ref 2	8,8		
SL11	A-12	Ref 1	139,4		
SL11	B-12	Well 1	138,5		
SL11	C-12	Well 2	134		
SL11	D-12	Well 3	124,9		
SL11	E-12	Well 4	118,8		
SL11	F-12	Well 5	111,7		
SL11	G-12	Well 6	86,3		
SL11	H-12	Ref 2	139,1		

test article	Well	Sample	Area / height	nm / amu	Note
SL12	A-1	Ref 1	4		
SL12	B-1	Well 1	11		
SL12	C-1	Well 2	9,1		
SL12	D-1	Well 3	7,2		
SL12	E-1	Well 4	3,9		
SL12	F-1	Well 5	3		
SL12	G-1	Well 6	1,8		
SL12	H-1	Ref 2	4		
SL13	A-2	Ref 1	135,2		
SL13	B-2	Well 1	39,9		
SL13	C-2	Well 2	40,8		
SL13	D-2	Well 3	28,6		
SL13	E-2	Well 4	25,8		
SL13	F-2	Well 5	18,1		
SL13	G-2	Well 6	20,7		
SL13	H-2	Ref 2	161,2		
Doxorubicin	A-4	Ref 1	269,7		
Doxorubicin	B-4	Well 1	248,8		
Doxorubicin	C-4	Well 2	209,6		
Doxorubicin	D-4	Well 3	203		
Doxorubicin	E-4	Well 4	160,4		
Doxorubicin	F-4	Well 5	127,9		
Doxorubicin	G-4	Well 6	75,6		
Doxorubicin	H-4	Ref 2	267,8		

Ref1	Lipid content							Ref2
1	2	3	4	5	6	7	8	
0,00 µl	0,05 µl	0,09 µl	0,15 µl	0,28 µl	0,50 µl	0,90 µl	0,0 µM	

9.2 Curriculum vitae

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 23. August 1990
Geburtsort: Bad Ischl
Staatsbürgerschaft: Österreich
Familienstand: ledig
Eltern: Heinz u. Christine Klug, geb. Ellmauer

Ausbildung

1996-2000 Volksschule Pfandl
2000-2008 Bundesgymnasium Bad Ischl
06/2008 Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
Seit 10/2008 Studium der Pharmazie an der Universität Wien
03/2013-06/2013 Spanisch Anfängerkurs 1 (A1/A2) an der Wirtschaftsuniversität Wien
08/2013-05/2014 Diplomarbeit am Department für klinische Pharmazie und chemische Diagnostik
10/2013-01/2014 Französisch Auffrischkurs an der Wirtschaftsuniversität Wien

Berufliche Erfahrung

07/2012 Praktikum in der Kur-Apotheke Bad Ischl
07/2013 Praktikum in der Marien-Apotheke Pfandl, Bad Ischl
10/2013-06/2014 Tutorium im Praktikum „Klinische Pharmazie und chemische Diagnostik“ an der Universität Wien

Fremdsprachen: Englisch, Französisch, Spanisch