

TETRAKAIN-ADRENALIN ANALYSE OG FORMULERING

Behrooz Jamshidi Gohari



Masteroppgave i galenisk farmasi
Farmasøytisk Institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2011

FORORD

Masteroppgaven er utført ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet i perioden mai 2010 til mai 2011.

Først vil jeg takke hovedveileder Jørgen Brustugun for all støtte, veiledning og oppmuntring jeg har fått i løpet av året. Takk for at du alltid har hatt tid til meg og mine spørsmål. En takk rettes også til veileder Solveig Kristensen for gode kommentarer og innspill i løpet av året.

Jeg vil også takke de ansatte ved seksjon Analyse og avdeling Produksjon ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet for god hjelp.

Behrooz Jamshidi Gohari

Oslo, Mai 2011

INNHOLDSFORTEGNELSE

SAMMENDRAG	6
FORKORTELSER	8
1. INNLEDNING	9
1.1 HENSIKT	9
1.2 BAKGRUNN	9
1.3 NESE OG SVELG, ANATOMI OG FYSIOLOGI	10
1.4 ABSORBSJON AV LEGEMIDLER GJENNOM SLIMHINNE	11
1.5 FORMULERING AV OPPLØSNINGER	12
1.5.1 Oppløsninger til overflateanestesi	12
1.5.2 Hjelpetoffer	13
1.5.3 Degassing av oppløsninger	15
1.5.4 Lokalanestetiske preparater som inneholder tetrakain og tetrakain-adrenalin	15
1.6 ADRENALIN	17
1.6.1 Indikasjoner	17
1.6.2 Administrasjonsveier og legemiddelformer	17
1.6.3 Farmakologiske egenskaper	17
1.6.4 Farmakokinetikk	18
1.6.5 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for adernalintartrat og adrenalin	18
1.6.6 Stabilitet	19
a) Oksidasjon	19
b) pH	19
c) Temperatur	20
d) Lys	20
e) Reaksjon med bisulfitt	21
1.6.7 Analyse	22
1.7 TETRAKAIN	23
1.7.1 Indikasjoner	23
1.7.2 Administrasjonsveier og legemiddelformer	23
1.7.3 Farmakologiske egenskaper	23
1.7.4 Farmakokinetikk	23
1.7.5 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for tetrakain og tetrakainhydroklorid	24
1.7.6 Tetrakainhydroklorids løselighet i forhold til pH	25
1.7.7 Stabilitet	25
a) Oksidasjon	25
b) Hydrolitisk nedbrytning	25
c) pH	26
d) Temperatur	26
e) Lys	26
1.7.8 Analyse	27

1.8 APPARATUR FOR VÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC) TIL KVANTITATIV OG KVALITATIV ANALYSE	27
1.8.1 Generelt om væskekromatografi	27
1.8.2 Hovedkomponentene i en væskekromatograf	28
1.8.3 Gradient og isokratisk eluering	28
1.8.4 Testing av systemets egnethet	28
1.9 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODER	29
1.10 KVANTITATIV HPLC-ANALYSE VED HJELP AV STANDARDKURVE	30
1.11 KVALITATIV ANALYSE VED HJELP AV UV- SPEKTROMETRI	30
2. EKSPERIMENTELT	31
2.1 STOFFLISTE	31
2.1.1 Råvarer til prøvebatcher	31
2.1.2 Preparat produsert ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, brukt ved metodeutvikling – ”gammel prøve”	31
2.1.3 Reagenser	31
2.2 INSTRUMENTER OG UTSTYR	33
2.3 LØSNINGER	36
2.3.1 Utvikling av HPLC-analysemetoder	36
2.3.2 Validering av HPLC-analysemetoder	37
2.3.3 Preformulering	41
3. METODER	46
3.1 UTVIKLING AV HPLC-ANALYSEMETODER FOR ADRENALIN OG TETRAKAIN	46
3.1.1 Valg av HPLC-kolonne	46
3.1.2 Valg av mobilfase	47
3.1.3 Valg av mobilfasehastighet	47
3.1.4 Valg av temperatur	47
3.1.5 Valg av eluent B	47
3.1.6 Valg av deteksjonsmetode og bølgelengde	47
3.2 BESKRIVELSE AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN	48
3.3 BESKRIVELSE AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN	50
3.4 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN	51
3.4.1 Linearitet	51
3.4.2 Nøyaktighet	52
3.4.3 Deteksjonsgrense (LOD)	52
3.4.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)	52

3.4.5 Bruksområde ("Range")	52
3.4.6 Systempresisjon	52
3.4.7 Interdagvariasjon	53
3.4.8 Intradagvariasjoner	53
3.4.9 Spesifisitet	53
3.4.10 Robusthet	54
3.4.11 Prøvestabilitet	54
3.5 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN	54
3.5.1 Linearitet	54
3.5.2 Nøyaktighet	55
3.5.3 Deteksjonsgrense (LOD)	55
3.5.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)	55
3.5.5 Bruksområde ("Range")	55
3.5.6 Systempresisjon	55
3.5.7 Interdagvariasjon	56
3.5.8 Intradagvariasjone	56
3.5.9 Spesifisitet	56
3.5.10 Robusthet	57
3.5.11 Prøvestabilitet	57
3.6 PREFORMULERINGSSTUDIER FOR TETRAKAIN OG TETRAKAIN-ADRENALIN	57
3.6.1 pH-stabilitetskurve for tetrakain	57
3.6.2 Undersøkelse av misfarging ved absorpsjonsmåling, visuell kontroll og mikroskopering	58
3.6.3 Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakain stabilitet- innledende forsøk	58
3.6.4 Effekt av EDTA på tetrakain stabilitet- innledende forsøk	58
3.6.5 Effekter av natriummetabisulfitt, EDTA, og adrenalin på stabiliteten av tetrakain	58
3.7 METODER FOR MULTIVARIAT DATAANALYSE	60
3.7.1 Generelt om multivariat dataanalyse	60
3.7.2 PLS-metoder og NIPALS-algoritme	60
3.7.3 Tolkning av analyseresultater ved hjelp av The Unscrambler® som verktøy for multivariat dataanalyse	61
4. RESULTATER OG DISKUSJON	62
4.1 UTVIKLING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN OG TETRAKAIN	62
4.1.1 Utvikling av HPLC-analysemetode for adrenalin	63
4.1.2 Kvalitativ analyse, identifisering av adrenalin	68
4.1.3 Utvikling av HPLC-analysemetode for tetrakain	71
4.1.4 Kvalitativ analyse, identifisering av tetrakain	72
4.2 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN	73
4.2.1 Linearitet	73
4.2.2 Nøyaktighet	74
4.2.3 Deteksjonsgrense (LOD)	74
4.2.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)	74

4.2.5 Bruksområde ("Range")	75
4.2.6 Systempresisjon	75
4.2.7 Interdagvariasjon	76
4.2.8 Intradagvariasjoner	76
4.2.9 Spesifisitet	77
4.2.10 Robusthet	78
4.2.11 Prøvestabilitet	79
4.3 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN	80
4.3.1 Linearitet	80
4.3.2 Nøyaktighet	80
4.3.3 Deteksjonsgrense (LOD)	81
4.3.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)	81
4.3.5 Bruksområde ("Range")	81
4.3.6 Systempresisjon	82
4.3.7 Interdagvariasjon	83
4.3.8 Intradagvariasjoner	83
4.3.9 Spesifisitet	84
4.3.10 Robusthet	85
4.3.11 Prøvestabilitet	86
4.4 PREFORMULERINGSSTUDIER FOR TETRAKAIN OG TETRAKAIN-ADRENALIN I OPPPLØSNING	87
4.4.1 pH-stabilitetskurve for tetrakain	87
4.4.2 Undersøkelse av misfarging ved absorpsjonsmåling, visuell kontroll og mikroskopering	88
4.4.3 Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakain stabilitet- innledende forsøk	89
4.4.4 Effekt av EDTA på tetrakain stabilitet- innledende forsøk	90
4.4.5 Effekter av natriummetabisulfitt, EDTA, og adrenalin på stabiliteten av tetrakain	91
<i>a) Stabilitet av tetrakain</i>	94
<i>b) Stabilitet av adrenalin</i>	97
<i>c) Effekt av nedbrytning og tilstedeværelse av adrenalin på misfarging</i>	99
<i>d) Innvirkning på pH</i>	101
5. KONKLUSJON	102
6. REFERANSER	104
7. VEDLEGG	107

SAMMENDRAG

Flere sykehusapotek i Norge har gjennom lengre tid produsert blandinger av tetrakain og adrenalin for lokalanestetisk bruk i øvre luftveier. Prosjektet har gått ut på å utvikle en stabil blanding som er egnet for lagerproduksjon samt å utvikle en eller flere analysemetoder for blandingen.

Som verktøy i kvantitativ og kvalitativ analyse for produktutviklingen ble det bestemt å benytte HPLC-analysemetoder. Ved spektrofotometriske absorbanmålinger ble bølgelengde ved maksimum UV-absorbans for tetrakain og adrenalin bestemt. Med utgangspunkt i tidligere analysemetoder (beskrevet i litteratur) ble forskjellige HPLC-kolonner, mobilfasesammensetninger og systembetingelser prøvd ut. To stabilitetsindikerende HPLC-analysemetoder for analyse av tetrakain og adrenalin i blanding er utviklet og validert i forhold til presisjon, nøyaktighet, deteksjonsgrense, kvantifiseringsgrense, spesifisitet, bruksområde, robusthet, linearitet og prøvestabilitet.

For å utvikle et preparat med forbedret holdbarhetstid ble det benyttet akselererte stabilitetsstudier. Langtids stabilitetsstudier ble ikke gjennomført – på grunn av tidsbegrensninger.

Stabiliteten av adrenalin og tetrakain ble undersøkt ved økt temperatur (autoklaving (121 °C i 16 minutter) og varmebehandling ved 70 °C over flere døgn).

Effekten av pH, natriummetabisulfitt og dinatriumedetat (EDTA) på stabiliteten av tetrakain, adrenalin og tetrakain-adrenalinblandinger ble studert under disse forholdene.

Det er funnet at tetrakainhydroklorid i løsning (alene uten adrenalin) har best stabilitet mellom pH 4 og 5 (70 °C, fem døgn).

Tetrakain har stor varmestabilitet ved pH 4. Etter autoklaving (121 °C i 16 minutter) og varmebehandling ved 70 °C i fem døgn er tetrakain mindre enn 2 % nedbrutt og degraderingen er ikke nok til å kunne studere effekten av natriummetabisulfitt og dinatriumedetat (EDTA) på stabiliteten. Adrenalin er derimot varmelabil og autoklaving (121 °C i 16 minutter) gir ca 5 % nedbrytning.

Det viste seg at det var behov for en lengre varmebehandlingsprosess med hensyn til å studere tetrakain nedbrytningen mer inngående.

Prøver av tetrakain og tetrakain-adrenalin i blanding ble varmebehandlet i et nytt regime som bestod av autoklaving (121 °C i 16 minutter) og varmebehandling i 30 døgn (70 °C).

Det er funnet at stabiliteten av tetrakain er relativt sett best ved en konsentrasjon av bisulfitt på 0,05 %. Dårligere stabilitet sees både ved lavere og høyere konsentrasjon av tilsetningsstoffet.

EDTA har derimot en klarere stabiliserende effekt på tetrakain, og effekten kan sees når løsningene inneholder 0,005 % EDTA eller mer.

Bisulfitt ser ut til å kunne virke både stabiliserende og destabiliserende på adrenalin alt etter konsentrasjon. EDTA derimot ser ut til å ha en stabiliserende effekt på adrenalin.

Løsninger av tetrakain og adrenalin er i utgangspunkt klare væsker, men det er blitt observert, både visuelt og ved absorbansmålinger, at løsningene, både hver for seg og i blanding, over tid og gjennom varmebehandling får en gul og siden gulbrun farge som skyldes nedbrytningsprodukter med UV-absorbans fra 400 nm til 600 nm.

Både tetrakain og adrenalin kan bidra til misfarging av en tetrakain-adrenalinblanding.

FORKORTELSER

H ₂ O ₂	hydrogenperoksid
TEA	trietylamin
EDTA	dinatrium etylendiamintetraacetat
AAPH	2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride
HPLC	High-performance liquid chromatography
ICH	International Conference of Harmonization
nm	nanometer
RSD	relativt standardavvik (%)
SD	standardavvik
RH	relativ fuktighet (%)
r^2	regresjonskoeffisient
R _t	retensjonstid
R _s	oppløsning (Resolusjon)
Ph. Eur.	Den europeiske farmakopé
UV	ultrafiolett stråling
% v/v	volumprosent
M ⁿ⁺	metallion med n+ ladning
% w/v	vekt/volum prosent
WFI	Water For Injection
MeOH	Metanol
ACN	Acetonitril

1. INNLEDNING

1.1 HENSIKT

Hensikt med prosjektet var å utvikle et tetrakain-adrenalinpreparat for overflateanestesi med forbedret holdbarhetstid. Man ønsket også å komme frem til en forenklet fremstillingsprosedyre.

Det var også et mål å utvikle en HPLC-metode for kvantitativ analyse av de to stoffene i blanding. Det ville være behov for en slik metode både under arbeidet med reformulering og under senere kvalitetssikring av et preparat.

1.2 BAKGRUNN

Ved norske sykehusapotek har det jevnlig blitt produsert sterile løsninger til overflateanestesi i nese, munn og svelg for lagerhold. Preparatene har inneholdt tetrakain samt et karkontraherende middel, adrenalin eller nafazolin. Over tid har det vist seg at disse preparatene har forbedringspotensialer på flere områder:

- Holdbarhetstiden har variert mellom én og seks måneder for Tetrakain-nafazolin, mens den for tetrakain-adrenalin har vært satt til tre måneder (basert på skjønnsmessig og individuell vurdering). Hva som er den reelle holdbarhetstiden har det vært vanskelig å fastslå siden det ikke foreligger en kvantitativ analysemetode for blandingene. En holdbarhetstid på inntil seks måneder er uansett kort – spesielt for et lagerprodusert preparat. Det ville derfor være fordelaktig om det kunne formuleres et preparat med lenger dokumentert holdbarhetstid.
- Produksjonen av preparatene har frem til i dag vært omstendelig siden den har tatt utgangspunkt i bruk av hjelpepreparater: Løsninger av tetrakain og adrenalin eller nafazolin har blitt laget hver for seg og deretter blitt varmebehandlet, før løsningene har blitt blandet i en aseptisk prosess. Dersom produksjonsprosessen kunne forenkles ville dette være en fordel.

Per i dag er det bare blandingen av tetrakain og adrenalin som er i produksjon; blandingen som inneholdt tetrakain sammen med nafazolin ble lagt ned for en tid tilbake. Ved oppstarten av det foreliggende prosjektet var det derfor primært aktuelt å undersøke stabiliteten til tetrakain-adrenalin og eventuelle hjelpepreparater. Det var interessant å undersøke stabiliteten opp mot parametre som pH, tilsats av antioksidanter/chelatorer, oppbevaringstemperatur, samt gassing med nitrogen og eventuelt CO₂.

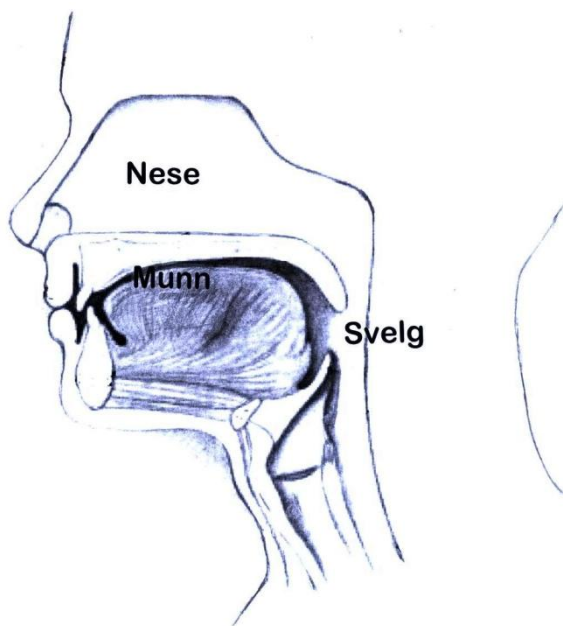
Det har tidligere blitt observert misfarging av de aktuelle preparatene. Løsninger av tetrakain og adrenalin er i utgangspunkt klare væsker, men det er blitt observert at løsningene, både hver for seg og i blanding, over tid får en gul og siden gulbrun farge. Det vil være interessant å se på sammenhenger mellom misfarging og nedbryting av virkestoff, samt å foreta undersøkelser for å kunne skille akseptabel og ikke-akseptabel fargeforandring på en begrunnet måte.

1.3 NESE MUNN OG SVELG, ANATOMI OG FYSIOLOGI

Tetrakain-adrenalin oppløsning brukes som lokalbedøvelse i nese, munn og svelg.

Nese, *nasus*, (Figur 1) består av nesehulen, bihulene og nesesvelgrommet.

Neseslimhinnen inneholder rikelig med begerceller og kjertler som til enhver tid opprettholder et lag av forholdsvis tyntflytende sekret på slimhinnen. Slimet inneholder bl.a. immunglobuliner som motvirker infeksjoner. Resten av slimhinnens epitel er forsynt med flimmerhår som transporterer sekretet i en konstant strøm mot svelget (Parker 2008).



Figur 1: Nese, munn og svelg anatomi

Munnhulen, *cavum oris*, (Figur 1) er første del av fordøyelsessystemet. Munnhulen er dekket av slimhinne som inneholder rikelig med spyttkjertler. Spytt er basisk og inneholder enzymet amylase som spalter polysakkarider. Spytten dreper bakterier og bidrar også til å bløte opp maten slik at den blir lettere å svelge (Parker 2008).

Svelget, *fauces* (Figur 1) er et muskuløst og nærmest rørformet, slimhinnekledd organ, som ligger foran virvelsøylen fra bunnen av kraniet til spiserøret, og inngår som en del av både de øvre luftveier og av fordøyelseskanalen. Svelget kan deles opp i to hoveddeler, den øverste delen ligger bak nesehulen (pars nasalis), den mellomste delen ligger bak munnhulen, (pars oralis) det er denne delen vi til daglig kaller svelget (Parker 2008).

1.4 ABSORBSJON AV LEGEMIDLER GJENNOM SLIMHINNE

Den anatomiske delen av nesehulen, munn og svelget som er av særlig interesse med hensyn til absorpsjon av legemidler er slimhinnen. Slimlaget har et tilnærmet nøytralt pH (6,1-7,8).

I nese og svelgets slimhinne (på epiteliale celleoverflaten) absorberes legemidler via to hovedmekanismer: den paracellulære (passiv diffusjon av små hydrofile molekyler) og den transcellulære (aktiv transport og/ passiv diffusjon) (Lloyd 2002).

Flateinnhold til nese og svelgets slimhinner er relativt stort fordi store deler av nesehulen er fylt av nesemuslingene og hele svelget er dekket av slimhinne. I slimhinnen, særlig på nesemuslingene, er det svært mange kar (Parker 2008).

Legemiddelmolekylets viktigste fysikalsk-kjemiske egenskaper som påvirker dets absorpsjon er:

- fettløselighet og foredelingskoeffisient;
- pKa;
- molekylær vekt og volum;
- vannløselighet;
- kjemisk stabilitet;

Legemiddelmolekylets fettløselighet (en viktig faktor når det gjelder absorpsjon) gis med dets lipid/vann likevekt foredelingskoeffisient som følge:

C_{lipid} = konsentrasjon av legemiddelet i fettfase

C_{vann} = konsentrasjon av legemiddelet i vannfase

P = lipid/vann foredelingskoeffisient = $C_{\text{lipid}}/C_{\text{vann}}$

- Hvis $\log P = 0$, det er lik distribusjon av molekylet i begge faser
- Hvis $\log P > 0$, molekylet er fettløselig
- Hvis $\log P < 0$, molekylet er vannløselig

Vannløselige legemidler med tilstrekkelig fettløselighet (passende lipid/vann foredelingskoeffisient, $\log P \approx 3-6$) absorberes lett over slimhinnen via passiv diffusjon (Lloyd 2002).

Drivkraften bak passiv diffusjon over biologiske membraner er konsentrasjonsgradient. Denne prosessen beskriver bevegelse av molekyler over en membran og hvor hastigheten er proporsjonal med konsentrasjonsgradienten over membranen og er avhengig av permeabilitetsegenskapene til membranen. Bare vann, gasser og små hydrofobe molekyler kan bevege seg over biologiske membraner ved passiv diffusjon som kan bli generelt forklart med Fick's lov.

Fick's lov om passiv diffusjon sier at diffusjonsstrømmen J er proporsjonal med konsentrasjonsgradienten for det aktuelle stoffet: $J = -D (dc/dx)$, der D , diffusjonskoeffisienten, er et makroskopisk mål for angjeldende atomers og molekylers bevegelighet. Minustegnet angir at strømmen går mot lavere konsentrasjon, c er konsentrasjon og x indikerer tilgjengelig overflateareal og membranens tykkelse. (Lloyd 2002).

Den store mengden blodkar i nesemuslingene gjør det imidlertid utfordrende å lage et preparat med lokal effekt siden virkestoff med noe vannløselighet ($\log p \approx 3$) raskt vil tas opp i blodstrømmen og føres bort. Én måte å begrense tapet på er å benytte seg av karkontraherende substanser – som adrenalin – i preparatet. En annen løsning kan være å benytte bioadhesive hjelpestoffer. Ved utvikling av bioadvesive legemiddelleveringssystemer kan holdtid ved absorpsjonsstedet og dermed kontakt med absorberende membran økes. Begge disse effektene kan føre til økt biotilgjengelighet og lokal effekt. Mucoadhesive og viskositetsøkende polymerer som metylcellulose, chitosan, og Carbopol 934P, kan brukes til å lage bioadhesive løsninger/suspensjoner for å optimalisere lokalt effekt.

1.5 FORMULERING AV OPPLØSNINGER

1.5.1 Oppløsninger til overflateanestesi

En løsning defineres som en blanding av to eller flere komponenter som danner et enkelt en-fase system som er homogen ned til molekylær nivå. *Løsningsmiddelet* er den komponenten som bestemmer oppløsningens fase og utgjør den største parten. De andre komponentene foreligger som *oppløst stoff* i løsemiddelet, i form av molekyler eller ioner (Aulton 2001).

Oppløsninger som legemiddelform har både fordeler og ulemper. En fordel er at et legemiddel administrert i form av en oppløsning allerede er tilgjengelig for absorpsjon og at en terapeutisk respons dermed kan inntre hurtigere. Ulempen er at farmakologisk aktive

ingredienser kan ha nedsatt kjemisk stabilitet og at de kan være et bedre medium for mikrobiell vekst.

Vandige løsninger er preparater laget med vann som løsningsmiddel. Noen legemidler er ustabile i vann eller er sensitive overfor oppløst karbon dioksid eller oksygen.

Hvis et legemiddel er en svak base eller syre, vil løseligheten blir påvirket av pH. Ved å justere pH eller lage buffersystemer med bestemt pH kan løseligheten av stoffer økes eller reduseres. Andre tiltak for å øke løseligheten er å tilsette hjelpestoffer som for eksempel surfaktanter eller overflateaktive stoffer.

Andre former for formuleringer som kan benyttes lokalt i nese og svelg er:

- *Suspensjoner*, dispersjon av et fast, findelt stoff (partikkelstørrelse $> 1 \mu\text{m}$) i en væske.
- *Emulsjoner*, et system bestående av to ikke blandbare væsker og en emulgator der den ene væsken er dispergert som dråper (0,1-100 μm) i den andre væsken.
- *Mikroemulsjoner*, er klare, termodynamisk stabile, homogene systemer som er dispersjon (i form av miceller dannet av surfaktant molekyler) av olje i vann eller vann i olje med dråpestørrelser på 5-140 nm.

Den europeiske farmakopeen har en egen definisjon av løsninger til bruk lokalt i nese og svelg (European Pharmacopoeia 2008):

“Oromucosal solutions and oromucosal suspensions are liquid preparations intended for administration to the oral cavity by means of a suitable applicator”

1.5.2 Hjelpestoffer i oppløsninger

Hjelpestoffer tilsettes oppløsninger av ulike årsaker. Buffersalter tilsettes for å opprettholde optimal pH, antioksidanter og chelatorer tilsetes for å redusere oksidering eller oksidativ nedbrytning. Konserveringsmidler tilsettes for å hindre mikrobiell vekst.

Når det gjelder oppløsninger til bruk på slimhinner er det strenge krav til hjelpestoffer som kan tilsettes (Nema 1997). Det er best å tilsette et minimum mengde av hjelpestoffer til preparatet. Hjelpestoffer som det er aktuelt å bruke som stabilisator i den foreliggende formuleringen, vil omtales nærmere i dette kapitlet.

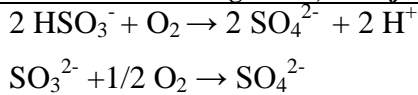
a) Antioksidanter

Antioksidanter kan deles i følgende tre grupper ut fra virkningsmekanismen (Nema 2002):

- 1) Ekte antioksidanter: kjedeterminerende antioksidanter som virker gjennom direkte reaksjon med frie radikaler
- 2) Reduksjonsmidler: stoffer som oksideres før legemidlet grunnet sitt lave redokspotensial
- 3) Antioksidantsynergister: stoffer som forsterker effekten av antioksidanter (eks. dinatriumedetat)

Natriummetabisulfitt ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) er et salt av svovelsyre (H_2SO_3) og en av de vanligste antioksidanter som tilsettes for å beskytte virkestoffene mot oksidasjon. I vandig løsning med sur pH vil natriummetabisulfitt umiddelbart dekomponeres til bisulfitt og sulfitt som har antioksidant effekt (Kirchhoefer 1986). Bisulfitt (HSO_3^-) og sulfitt (SO_3^{2-}) vil konkurrere med legemiddelet i reaksjon med O_2 (Tabell 1) og dermed beskytte virkestoffene mot oksidering.

Tabell 1: Bisulfitt og sulfitt, reaksjon med O_2 (Connors 1986)



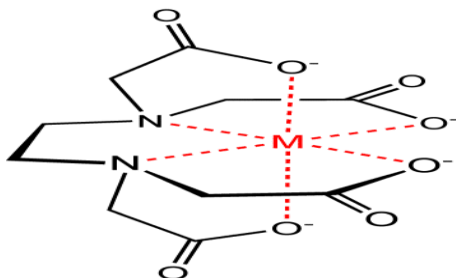
Konsentrasjonsintervallet av natriummetabisulfitt (i vandige løsninger) som benyttes i farmasøytiske preparater er 0,02-1 % w/v (Nema 2002).

b) Chelatorer

Chelatorer har en indirekte antioksidanteffekt ved å kompleksbinde og fange opp metallioner som ellers ville kunne katalysere oksideringsreaksjoner. Spormetaller kan for eksempel stamme fra vann og andre råvarer.

EDTA (dinatriumedetat) er den vanligste chelatoren som brukes i legemiddelindustrien.

EDTA har en forgrenede molekyllær struktur (Figur 2) som legger seg rundt metallionene, kompleksbinder dem og dermed fanger dem opp.



Figur 2: EDTA Metallionkompleks

Konsentrasjonsintervallet av EDTA (i vandige løsninger) som benyttes i farmasøytiske preparater er 0,01-0,11 % w/v (Nema 2002).

c) Andre hjelpestoffer

Av andre tilsetningsstoffer det kan være aktuelt å bruke kan det nevnes askorbinsyre som antioksidant samt pH-regulerende stoffer (syre, lut og eventuelt buffere).

Konserveringsmidler brukes i en del oppløsninger. I noen formuleringer tilsettes parabener som konserveringsmiddel.

1.5.3 Degassing av oppløsninger

Inert gass kan brukes for å fjerne løst oksygen og dermed redusere oksidering. Hovedsakelig benyttes nitrogen til formålet, men andre gasser kan også brukes, for eksempel karbondioksid.

1.5.4 Lokalanestetiske preparater som inneholder tetrakain og tetrakain-adrenalin

Lokalanestetiske preparater er legemidler, som ved lokal applikasjon kan medføre reversibel opphevelse av nerveledning i perifere nerver. Disse preparatene anvendes klinisk ved for eksempel lokalanestesi i oftalmologisk praksis, nese øre hals praksis, odontologi, og ved sentral nerveblokkade (epidural og spinal).

Tabell 2 viser lokalanestetiske preparater med markedsføringstillatelse og preparater produsert av sykehusapotekene.

Tabell 2: Lokalanestetiske preparater som inneholder tetrakain og eventuelt adrenalin eller nafazolin (registrerte preparater og preparater produsert av sykehusapotekene)

Preparat	Innholdsstoffer	Indikasjon
Tetrakain Minims øyedråper, endosebeholdere 10 mg/ml (1 %) Chauvin Pharmaceuticals Ltd. Surrey, England	1 ml inneh: Tetrakainhydroklorid 10 mg, saltsyre til pH 4, sterilt vann	Lokalanestesi i oftalmologisk praksis
Tetrakain-10mg/ml – Nafazolin-0,25mg/ml Rikshospitalets apotek	1 ml inneh: Tetrakainhydroklorid 15 mg, nafazolinhydroklorid 0,25 mg, natriumklorid 6,3 mg, metyltioninklorid 7,5 µg, metylparahydroksybenzoat 0,1 %, sterilt vann	Lokalanestesi i nese/øre/ hals praksis
Tetrakain-16mg/ml – Adrenalin-0,2mg/ml (preparatet lages ved å blande hjelpeløsninger av tetrakain 20mg/ml og adrenalin 1mg/ml) Ullevål apotek	Tetrakain 20mg/ml hjelpeløsning: 1 g inneh: Tetrakainhydroklorid 20 mg, natriumklorid 5,5 mg, metyltioninklorid 30 µg, saltsyre 0,1 mol/l 10mg, metylparahydroksybenzoat 0,5 mg, sterilt vann Adrenalin 1mg/ml hjelpeløsning: 1 g inneh: Adernalintartrat 1,81 mg, natriummetabisulfitt 0,5 mg, natriumklorid 8,45 mg, metylparahydroksybenzoat 0,1 mg, sterilt vann	Lokalanestesi i nese/øre/ hals praksis
Tetrakain-16mg/ml – Adrenalin-0,2mg/ml (preparatet lages ved å blande hjelpeløsninger av tetrakain 2 % og adrenalin 1mg/ml) Sykehusapotekene i midt – Norge HF	Tetrakain 2 % hjelpeløsning: 1 mg inneh: Tetrakainhydroklorid 20 mg, natriumklorid 5,5 mg, metyltioninklorid 30 µg, saltsyre 0,1 mol/l 10mg, metylparahydroksybenzoat 0,5 mg, sterilt vann Adrenalin 1mg/ml hjelpeløsning: 1 mg inneh: Adernalintartrat 1,81mg, natriummetabisulfitt 0,5 mg, natriumklorid 8,45 mg, metylparahydroksybenzoat 0,1 mg, sterilt vann	Lokalanestesi i nese/øre/ hals praksis

1.6 ADRENALIN

1.6.1 Indikasjoner

Indikasjonene for bruk av adrenalin er asystole, hjertestans og alvorlige anafylaktiske reaksjoner. Det brukes også ved kardiogent sjokk eller uttalt hjertesvikt med hypotensjon, alvorlig hypotensjon av annen årsak og kraftig astmaanfall, særlig hos barn. Videre brukes stoffet mot bronkialslimhinneødem og akutt subglottisk laryngitt (falsk krupp) hos barn (inhalasjon av forstøvet *racemisk* adrenalin). Stoffet brukes også for å frembringe lokal vasokonstriksjon (Norsk legemiddelhåndbok 2010).

1.6.2 Administrasjonsveier og legemiddelformer

Adrenalin administreres i form av inhalasjon, parentral og transdermalt (og via slimhinner). Av legemiddelformer kan det nevnes adrenalin injeksjonsvæske, oppløsning i autoinjektor, adrenalin inhalasjonsaerosol og øyedråper.

1.6.3 Farmakologiske egenskaper

Adrenalin er et katekolamin, tilhører farmakologisk gruppen adrenergikum og er klassifisert med ATC-kode C01CA24.

Adrenalin gir en relativt balansert stimulering av de adrenerge reseptorhovedtypene: Alfa₁-, alfa₂- og betareseptorene og stimulerer subtypene beta₁- og beta₂-reseptorene omtrent like effektivt. Sammenlignet med noradrenalin har imidlertid adrenalin en klar preferanse for beta₂-reseptorene. Det relative effektbidrag fra de ulike reseptorer varierer med dosen.

Adrenalin har en kraftig stimulerende effekt på hjertet (kontraksjon, frekvens, ledningshastighet, metabolisme). Effekten på blodårer og dermed den totale perifere motstand varierer både kvantitativt og kvalitativt med dosen (Norsk legemiddelhåndbok 2010).

Adrenalin stimulerer α_1 -adrenerge reseptorhovedtypene i blodkar i nesens og svelgets slimhinner. Som en følge av vasokonstriksjon reduseres blødning under kirurgisk inngrep (H. P. Rang 2003).

Ved høye doser øker blodtrykket markert. I hud, slimhinner og nyrer fås imidlertid vasokonstriksjon, også i lave doser (Norsk legemiddelhåndbok 2010).

1.6.4 Farmakokinetikk

Adrenalin administreres i form av inhalasjon eller parenteralt. Stoffet raskt brytes ned i mage-tarm kanalen og derfor ikke kan gis peroralt. Ved subkutan injeksjon forsinkes absorpsjonen noe på grunn av lokal karkonstriksjon. Effekten inntreer etter 3–5 minutter, noe raskere ved i.m. injeksjon. Rask effekt oppnås ved inhalasjon og ved i.v. tilførsel. Stoffet metaboliseres av enzymer MAO og COMT, først og fremst i lever og det dannes inaktive metabolitter.

Adrenalin utskilles via nyrene, hovedsakelig metabolisert (Norsk legemiddelhandbok 2010).

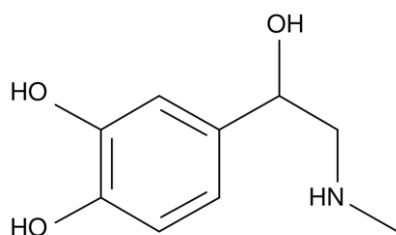
1.6.5 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for adernalintartrat og adrenalin

Tabell 3 viser fysikalsk-kjemiske egenskaper for adernalintartrat og adrenalin (Parfitt 1999).

Tabell 3: Fysikalsk-kjemiske egenskaper for adernalintartrat og adrenalin

Adrenalintartrat	
Kjemisk navn	1,2-benzendiol,4-[1-hydroksy-2-(metylamino)etyl]-,(R)-,[R-(R*,R*)]-2,3-dihydroksybutandioat (1:1)
Molekylformel	C ₉ H ₁₃ NO ₃ ,C ₄ H ₆ O ₆
Molekylvekt	333.3 g/mol
Utseende	Hvitt til gråhvitt til brungrått krystallinsk pulver. Uten lukt.
Løselighet	1:3 vann, noe løselig i alkohol.
Adrenalin	
Molekylformel	C ₉ H ₁₃ NO ₃
Molekylvekt	183,2 g/mol
Log P	-0.539±0.352
pKa	Adrenalin har to ioniserbare grupper med pK ₁ 8,71 og pK ₂ 9,90
Maks. UV-absorbans	198, 220, 280 nm (Vandig løsning)
Utseende	Hvit pulver uten lukt.
Løselighet	" <i>Very Soluble</i> " (1000 g/L) i vann ved pH4 og 25 °C

Figur 3 viser strukturen til adrenalin.

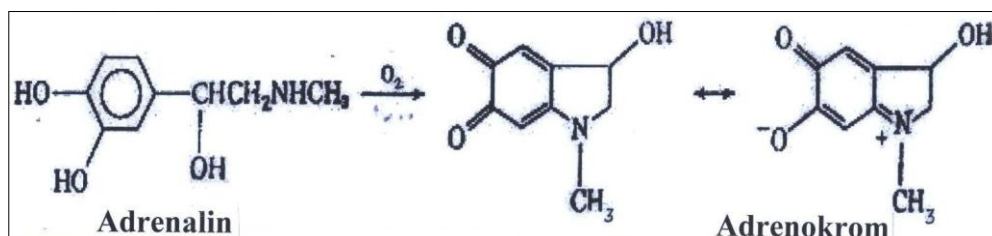


Figur 3: Strukturformel for adrenalin

1.6.6 Stabilitet

a) Oksidasjon

Katekoldelen av adrenalin molekylet er spesielt utsatt for oksidering. Oksidasjonen skjer via både autooksidasjon (i nærvær av O_2 (Figur 4)) og reversibelt tap av elektroner uten addisjon av oksygen (Connors 1986). Oksidasjon fører til dannelse av rosa og røde forbindelser som leukoadrenokrom, adrenokrom (Figur 4) og til slutt svarte partikler av polymere melaninforbindelser. Oksidasjon katalyseres av tungmetallioner, for eksempel Fe^{3+} og Cu^{2+} . Oksidasjon kan hindres ved å tilsette en antioksidant, fjerne oksygen ved hjelp av inert gass, binde opp tungmetallioner ved hjelp av chelator, samt å benytte lav pH i løsningen da oksidasjon katalyseres av base (Connors 1986).

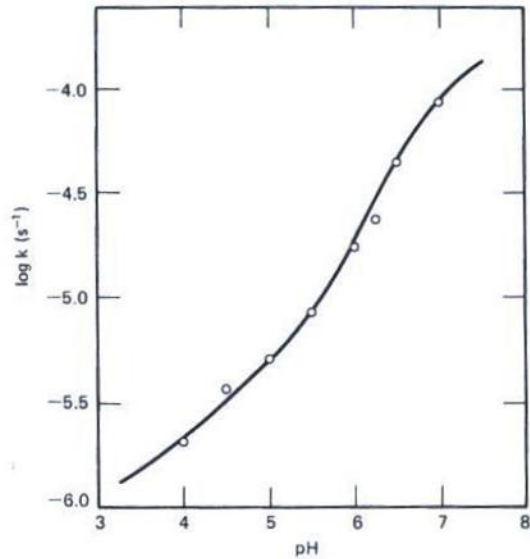


Figur 4: Oksidasjon av adrenalin

b) pH

Adrenalin har to ioniserbare grupper med pK_1 8,71 og pK_2 9,90. I basisk miljø øker oksidativnedbrytningen av adrenalin (Connors 1986). Adrenalininjeksjonen i B.P. har pH 2,8 til 3,6, og denne kan steriliseres ved autoklavering (British Pharmacopoeia 2005). Optimal stabilitet oppnår den vandige løsningen ved pH 3,6 (Parfitt 1999).

Adrenalin kan også nedbrytes på andre måter – som også er avhenging av pH. Stoffet kan reagere med bisulfitt (Figur 5) eller det kan racemiseres. Racemisering er syrekatalysert og $\log k$ mot pH gir en konstant på -1,21 (Connors 1986).



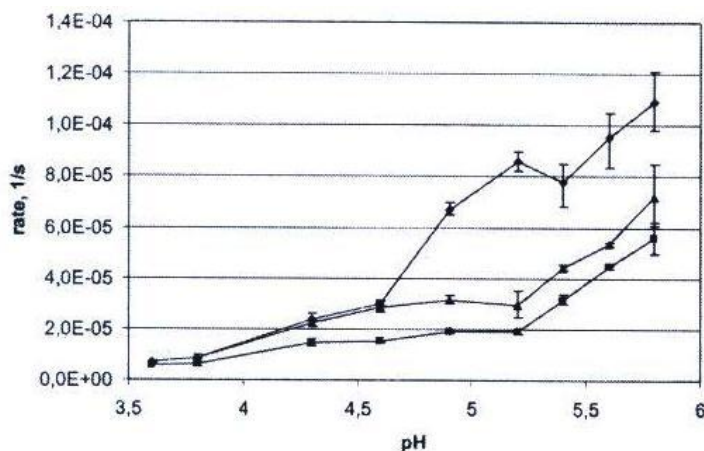
Figur 5: Adrenalins pH-hastighets profil for tap av bisulfitt i en adrenalinløsning ved 68 °C, (utgangskonsentrasjoner: Adrenalin 0,082 M; bisulfitt 0,0192M) (Connors 1986)

c) Temperatur

Økt temperatur kan akselerere oksidativ nedbrytning av adrenalin. I følge preparatomtale for Xylocain Dental adrenalin Dentsply, skal preparate oppbevares ved høyst 15 °C. Preparatomtale for Adrenalin Nycomed Pharma setter to års holdbarhet på kaldt sted, beskyttet mot lys og inntil 6 måneder ved romtemperatur (Felleskatalogen 2010).

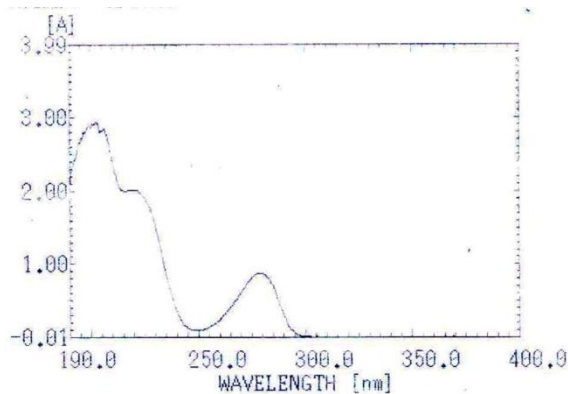
d) Lys

Adrenalin skal beskyttes mot lys, fordi lys katalyserer oksidasjon og dermed nedbrytningen (N. J. de Mol 1979). Følsomheten for lys er pH-avhengig (Figur 6) (Brustugun 2005).



Figur 6: Første ordens hastighetskonstant (s⁻¹) for fotodegradering av adrenalin (♦) som funksjon av pH (Kurver for dopamin (▲) og isoprenalin (■) er også vist) (Brustugun 2005)

Adrenalin absorberer ikke lys med bølgelengder over 300 nm (Figur 7) men stoffets stabilitet kan bli indirekte påvirket av lys.



Figur 7: Adrenalins absorbans-spektrum i vandig løsning (190-400 nm)

e) Reaksjon med bisulfitt

Natriummetabisulfitt brukes ofte som antioksidant i adrenalinløsninger. Ulempen med å inkludere bisulfitt er at adrenalin og bisulfitt kan reagere med hverandre (Figur 5) og dermed danne den farmakologisk inaktive sulfonat formen (Connors 1986). Tilsetning av borsyre kan forhindre dannelsen av sulfonatet (Sidney Riegelman 1962).

Bisulfitt kan også reagere med nedbrytningsproduktet adrenokrom, og danne adrenokrom sulfonat. Adrenokromsulfonat kan absorbere UV-A lys og produsere reaktivt singlet oksygen (Brustugun 2004). Bisulfitt kan på denne måten gjøre adrenalinpreparater følsomme for lys.

1.6.7 Analyse

Apoteket har ingen analysemetode tilgjengelig for analyse av adrenalin i blanding med tetrakainn. En slik metode må derfor utvikles. Siden adrenalin og dets vanligste nedbrytningsprodukter har god UV-absorbans er HPLC-metodikk med UV-deteksjon godt egnet til formålet. I arbeidet med å utvikle en analysemetode vil det være naturlig å ta utgangspunkt i metoder for analyse av adrenalin for seg som allerede finnes. Tabell 4 viser en oversikt over metoder for analyse av adrenalin som finnes beskrevet.

Tabell 4: tidligere metoder brukt til adrenalin analyse

Kolonne type	Mobilfase sammensetning	Detektor	Kilde
C18, 250 mm x 4.6 mm, 10 µm	vann:metanol:acetonitril:85% fosforsyre: Natrium oktanesulfonate (700:200:100:5:1.08g)	UV ved 220 nm	(Wilson 1990)
LiChrospher RP18, 5mm 125 mm x 4 mm	0.06 mol/l KH ₂ PO ₄ , 50mg/l EDTA(Na) ₂ , 100mg/l Natriumoctansulfat, 1,3 Vol.-% CH ₃ OH, pH 3,5 mit 5,0 mol/l H ₂ PO ₄	UV ved 280 nm	(Baran 1993)
Alkyl phenyl (P/N 27198), 30 cm x 3.9 mm	15% methanol	UV ved 220 nm	(Juenge 1982)
C8	0.05 M monobasic sodium phosphate- 519 mg Na-1-otan sulfonat og 45 mg of natrium etylenediaminetetraacetate (pH 3.8) 85:15 metanol	UV ved 220 nm	(Loyd 1993)
Lichrosorb RP-18, 25 cm x 4.6 mm	5 mM oktane sulfonsyre, 3% acetonitrile, og 1% metanol pH 3.5	UV ved 220 nm	(Kirchhoefer 1986)
Phenomenex, 250 mm x 4.6 mm,5 µm	Acetonitrile (181:19, v/v), 12.6 mM sitronsyre, 11.60 mM (NH ₄) ₂ HPO ₄ , 2.54 mM natriumoktylsulfonate, 3.32 mM DBAP og 1.11 mM EDTA. pH3.8.	UV ved 220 nm	(Chin 1992)
C18, 100 mm x 4.6mm 3 µm,	<u>(Gradient eluering, mobilfase A og B):</u> 0.05 M natriumacetate(pH. 7.0)- acetonitrile-metanol in a ratio of 60:20:20 (v/v/v)(A) 30:60:10 (v/v/v)(B) 0.0-6.0 min: 52%A,48%B og 6.0- 6.1min 100%B	UV ved 220 nm	(Alberts 1992)
Supelcosil LC-DP, 4,6 x 100 mm, 5µm	Metanol 20 % - 80 % fosfatbuffer 0,005 M pH 3,60	UV ved 220 nm	Rikshospita- lts apotek, analyse- forskrifter

1.7 TETRAKAIN

1.7.1 Indikasjoner

Tetrakain brukes som lokalanestetika for lokal- og regionalanestesi i oftalmologisk praksis, nese/øre/hals praksis, odontologi, og ved sentral nerveblokkade (epidural og spinal) (Parfitt 1999).

1.7.2 Administrasjonsveier og legemiddelformer

Tetrakain administreres hovedsakelig transdermalt (og via slimhinner) og parentralt. Av legemiddelformer kan det nevnes oppløsninger, kremer, injeksjonsvæske og øyedråper.

1.7.3 Farmakologiske egenskaper

Tetrakain tilhører gruppen anestetika for lokal- og regionalanestesi og er klassifisert med ATC-kode S01H A03.

Tetrakain er en aminobenzosyreester som hindrer ledning av nerveimpulser ved å blokkere natrium kanaler. Stoffet har kraftig og hurtig innsettende effekt. Effekten varer ca. 15 minutter avhengig av dose (Tetrakain Minims, øyedråper) (Norsk legemiddelhandbok 2010).

1.7.4 Farmakokinetikk

Tetrakaine er rapportert å ha om lag 15 % biotilgjengelighet etter påføring av en 4 % gel på intakt hud, med en gjennomsnittlig halveringstid på ca 75 minutter (Parfitt 1999).

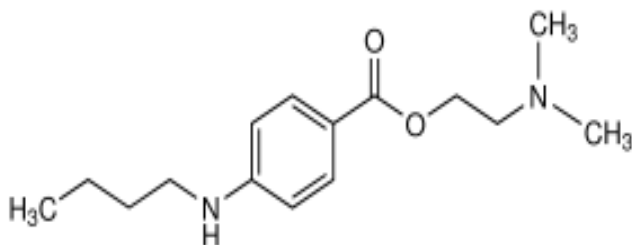
1.7.5 Fysikalsk-kjemiske egenskaper for tetrakain og tetrakainhydroklorid

Tabell 5 viser fysikalsk-kjemiske egenskaper for tetrakain og tetrakainhydroklorid.

Tabell 5: Fysikalsk-kjemiske egenskaper for tetrakain og tetrakainhydroklorid

Tetrakain	
Synonymer	Amethocaine; Dicainum
Kjemisk navn	2-Dimethylaminoethyl 4-butylaminobenzoate
Molekylformel	$C_{15}H_{24}N_2O_2$
Maks. UV-absorbans	200, 230 og 310 nm (i vandig løsning)
Molekylvekt	264,4 g/mol
Utseende	Et hvit eller lys gult voksaktig fast stoff
Løselighet	Veldig lite løselig i vann (mellom 1:1000 til 1:10000) Løselig 1 del i 5 deler alkohol og 1del i 2 deler kloroform eller eter, løselig i benzen.
Tetrakainhydroklorid	
Molekylformel	$C_{15}H_{24}N_2O_2, HCl$
Molekylvekt	300,8 g/mol
Utseende	Et hvit eller nesten hvit, litt hygroskopisk, polymorft, krystallinsk pulver.
Løselighet	Fritt løselig i vann, løselig i alkohol
Log P	3.749 ± 0.541
PKa	8,39

Figur 8 viser strukturen til tetrakain.



Figur 8: Strukturformel for tetrakain

1.7.6 Tetrakainhydroklorids løselighet i forhold til pH

Siden det er en stor forskjell mellom vannløseligheten til tetrakain og dets hydroklorid salt, vil endringer i pH sterkt kunne påvirke løseligheten til tetrakainhydroklorid. For å finne optimal pH i forhold til løselighet, kan pHp (utfellings-pH) beregnes.

Beregninger (se vedlegg, tabell 53) viser at en løsning av tetrakainhydroklorid på 18.2 mg/ml (tilsvarende 16 mg/ml tetrakain) i romtemperatur (25 °C) feller ut ved $\text{pH} \geq 6.20-7.21$.

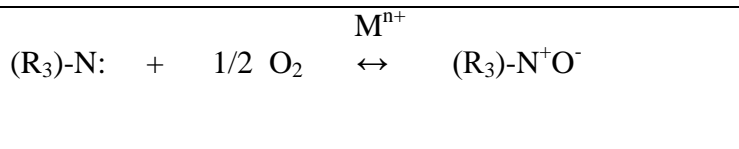
Utfellingspunktet er gitt som et intervall fordi løseligheten av tetrakain er noe usikker (mellom 1:1000 til 1:10000).

1.7.7 Stabilitet

a) Oksidasjon

Den tertiære amin gruppen i tetrakain molekylet er spesielt utsatt for oksidasjon (Figur 9).

N-oksideringsreaksjonen kan skje i nærvær av molekylær oksygen og reaksjonen katalyseres av metall ioner (for eksempel Fe^{2+}) (Silverman 2004).

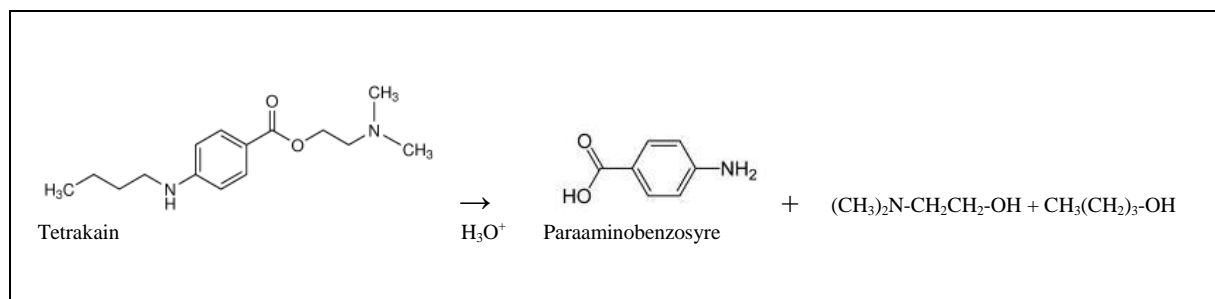


Figur 9: oksidasjonsreaksjon for tertiær aminer

b) Hydrolytisk nedbrytning

Syrekatalysert hydrolyse er den viktigste nedbrytningsprosessen for tetrakain i vandig løsning.

stoffet blir hydrolysert til p-aminobenzosyre (Figur 10) (Silverman 2004).



Figur 10: Hydrolytisk nedbrytning av tetrakain

c) pH

En 1 % tetrakainhydrokloridløsning i vann har en pH på 4.5 til 6.5. I pH-områder over 6,5 vil tetrakain feller ut. Ved lav pH (<4) vil syrekatalysert nedbrytning av esterbindingen og oksidasjon av tertiæramin gruppen øke (Silverman 2004).

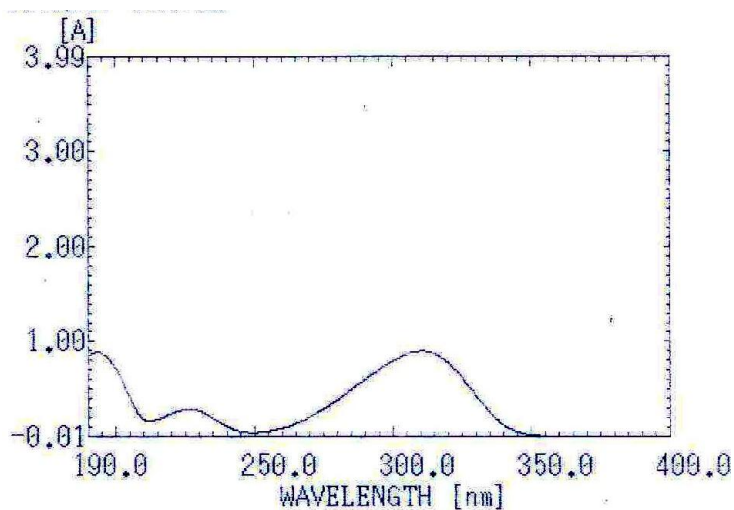
d) Temperatur

Økt temperatur vil akselerere både hydrolytisk og oksidativ nedbrytningen av tetrakain. Stoffet skal oppbevares i romtemperatur (Parfitt 1999).

e) Lys

Tetrakain skal beskyttes mot lys, fordi lys katalyserer oksidasjon og dermed nedbrytningen av stoffet (Parfitt 1999).

Tetrakain absorbans-spektrum går over 310 nm (Figur 11) og stoffet kan påvirkes direkte av lys.



Figur 11: Tetrakains absorbans-spektrum i vandig løsning (190-400 nm)

1.7.8 Analyse

Apoteket har ingen analysemetode tilgjengelig for analyse av tetrakain i blanding med adrenalin. En slik metode må derfor utvikles. Siden tetrakain og dets vanligste nedbrytningsprodukter har god UV-absorbans er HPLC-metodikk med UV-deteksjon godt egnet til formålet. I arbeidet med å utvikle en analysemetode vil det være naturlig å ta utgangspunkt i metoder for analyse av tetrakain for seg som allerede finnes.

Tabell 6 viser en oversikt over metoder for analyse av tetrakain som finnes beskrevet.

Tabell 6: Tidligere HPLC-analyse metoder brukt for tetrakain

Kolonne type	Mobilfase sammensetning	Detektor	Kilde
C ₁₈	pH 5.9 fosfatbuffer (0.05 M) 20% (v:v) acetonitril	UV ved 310 nm	(Kang 2003)
LiChroCart [®] Superspher [®] 60 PR125mm x 4 mm, 4 µm	75% phosphate buffer (8.0 g NaH ₂ PO ₄ i 1 l H ₂ O, pH 4.6 25% CH ₃ CN	UV ved 310 nm	(Sattler 1998)
µBondapak CN, 10 µm, Waters Associates, Milford, MA 01757	0,01 M 1-oktanesulfonsyre natrium salt, 0,1 mM EDTA, 2 % (v/v) edikksyre, 2 % (v/v) acetonitril, og 1 % (v/v) metanol	UV ved 310 nm	(Waraszkiewicz 1981)

1.8 APPARATUR FOR VÆSKEKROMATOGRAFI (HPLC) TIL KVANTITATIV OG KVALITATIV ANALYSE

1.8.1 Generelt om væskekromatografi

HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) er en av mest brukte metodene til å bestemme legemidler i farmasøytiske preparater og i biologiske materiale. Metoden baserer seg på at mobilfase som er en væske, presses gjennom en kolonne pakket med materiale som retarderer stoffene. Stoffene injiseres i strømmen av mobilfase før kolonnen. Stoffet som mobilfase bringer ut av kolonnen, detekteres med en detektor. Separasjonsprinsippene som brukes er enten, normalfasekromatografi, eksklusjonskromatografi, eller omvendt-fasekromatografi – som er det klart viktigste prinsippet.

1.8.2 Hovedkomponentene i en væskekromatograf

- Pumpe, presser mobilfase med konstant hastighet gjennom kolonnen
- Injektor, injiserer bestemt volum av prøveløsningen
- Kolonne, en typisk 5-25 cm lange stålrør pakket med stasjonærfase
- Detektor, gir en respons (elektrisk signal proporsjonal med konsentrasjon/masse) for de stoffene som skal detekteres

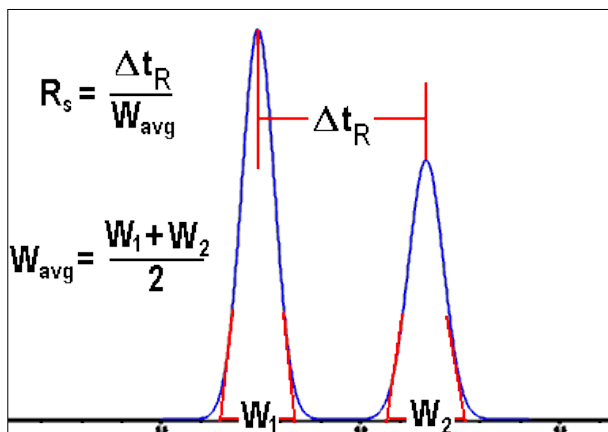
1.8.3 Gradient og isokratisk eluering

Når analysebetingelsene holdes konstant under analysen, kalles det isokratisk eluering. Når betingelsene endres under analysen kalles det gradient eluering.

1.8.4 Testing av systemets egnethet

Før det utføres valideringsarbeid, må en forsikre seg om at det kromatografiske systemet er godt nok. Testing av systemets egnethet skal sikre at det analytiske systemet som helhet fungerer tilfredsstillende for oppgaven før mye arbeid legges ned i validering. Et viktig mål på egnethet er oppløsningsevne (*Resolution, R_s*).

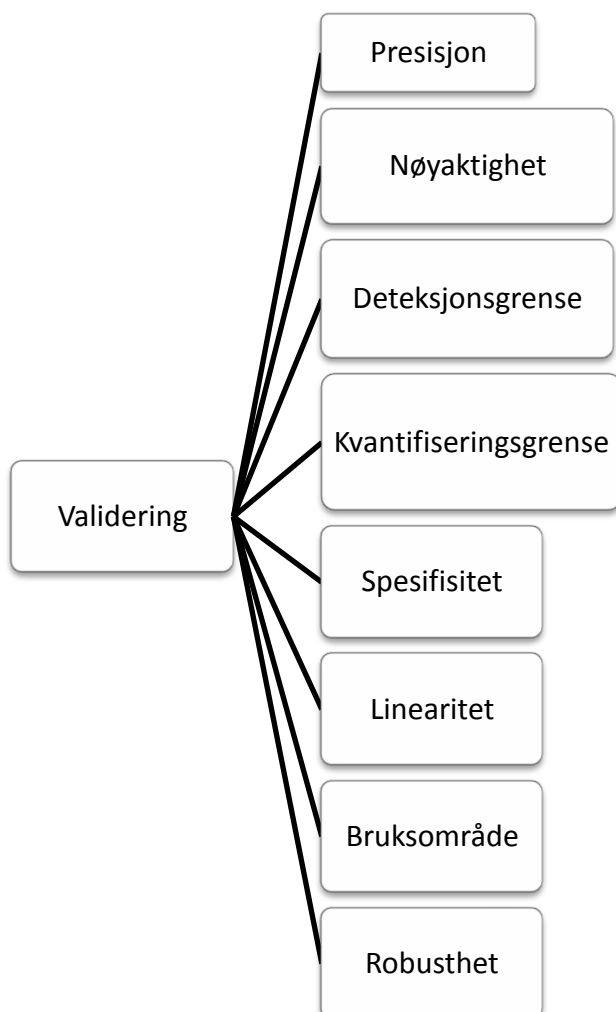
Oppløsningsevne (*R_s*) gir et kvantitativt uttrykk for hvor godt toppene er separert (Figur 12).



Figur 12: Oppløsningsevne (*R_s*)

1.9 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODER

Alle analysemetoder som benyttes i farmasøytisk virksomhet, skal valideres. Valideringen utføres ved å kartlegge metodens egenskaper ved såkalte valideringsparametere. ICH (International Conference of Harmonization) har utarbeidet retningslinjer for hvilke parametre som skal valideres. Europa, USA og Japan har vedtatt å følge disse retningslinjene. Figur 13 viser en oversikt over valideringsparametere (Rasmussen 2004).



Figur 13: Parametre som gjerne inngår i validering av HPLC-analysemetoder

1.10 KVANTITATIV HPLC-ANALYSE VED HJELP AV STANDARDKURVE

Kvantitative analyser baserer seg på sammenhengen mellom konsentrasjon eller mengde stoff i mobilfasen og detektorens respons. Både topphøyde og toppareal kan benyttes til å bestemme konsentrasjonen ved hjelp av standardkurve. Standardkurven lages ut fra stoff av kjent kvalitet og gir sammenhengen mellom konsentrasjon av stoffet i løsningen og stoffets topphøyde eller toppareal.

Regresjonskoeffisienten (r) er den viktigste parameteren som uttrykker standardkurvets egnethet for kvantitativ analyse. Parameteren forteller om hvorvidt responsen er en lineær funksjon av konsentrasjon (Rasmussen 2004).

1.11 KVALITATIV ANALYSE VED HJELP AV UV- SPEKTROSKOPI

HPLC-systemer med "*Photodiode Array (PDA)*" detektor byr på flere muligheter og kan gi tredimensjonale opplysninger om analytten. Detektoren kan gi et fullt UV-spektrum av toppen, og kan brukes ved identifisering. Det er også lett å endre bølgelengden under analysen, slik at hvert stoff kan detekteres ved optimal bølgelengde.

I tillegg til identifikasjon ved hjelp av HPLC med PDA kan UV-spektroskopi benyttes. Ved slik identifisering er det normalt å ta opp et UV-spektrum, hvor absorbansen til stoffet registreres som funksjon av bølgelengde. Forskjellige stoffer har forskjellige UV-spektre. Et ukjent stoff kan identifiseres ved begge metoder dersom spekteret av det ukjente stoffet er identisk med et referansespektrum for et kjent stoff (Rasmussen 2004).

2. EKSPERIMENTELT

2.1 STOFFLISTE

2.1.1 Råvarer til prøvebatcher

- 1) Adrenalartratar, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, K.nr. 012304
- 2) Tetrakainhydroklorid, Apotekproduksjon AS, Oslo, Norge, K.nr. 009302
- 3) Tetrakainhydroklorid, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, K.nr. 009304
- 4) Metylparaben, Apotekproduksjon AS, Oslo, Norge, K.nr. 100819

2.1.2 Preparat produsert ved Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, brukt ved metodeutvikling – ”gammel prøve”

Tetrakain 13,3 mg/ml (gammel tetrakain preparat, utløpsdato 21.04.2007, batchnr.504764)

2.1.3 Reagenser

- 1) Buffer løsnings pH 7.00 (20°C) CertiPUR®, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 101305
- 2) Buffer løsnings pH 4.00 (20°C) CertiPUR®, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 101304
- 3) Trietylamin, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 101309
- 4) Acetonitril HPLC grade, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, K.nr. 101308
- 5) Metanol HPLC grade, Rathburn Chemicals Ltd., Skottland, K.nr. 001931
- 6) Adrenokrom, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, Lot nr. 029K1155
- 7) 4-(Butylamino)- benzosyre, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, K.nr. 008301
- 8) Fosforsyre 1,0 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 010203
- 9) Natriumhydroksid 1,0 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 003201
- 10) Saltsyre 0,1 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 011201
- 11) Natriummetabisulfitt, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 101311
- 12) Dinatriumedetat pyrogenprøvd, NMD, Oslo, Norge, K.nr. 806314
- 13) Kaliumdihydrogenfosfat, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 002301
- 14) Dikaliumhydrogenfosfat, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 007303
- 15) Hydrogenperoksid 30%, Apotekproduksjon AS, Oslo, Norge, K.nr. 009301
- 16) 2,2'-Azobis(2-metylpropionamidin) dihydroklorid (AAPH) - granular, 97% Aldrich, Steinheim, Tyskland, Lot nr. 11120JC-505
- 17) Natrium-1-heptasulfonat, K. nr. 010003

- 18) Saltsyre 1 M, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo, Norge, K.nr. 910203
- 19) Edikksyre, Merck, Darmstad, Tyskland, K.nr. 006301
- 20) Milli-Q-vann nytappet, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo
- 21) Sterilt vann (WFI) nytappet, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet, Oslo

2.2 INSTRUMENTER OG UTSTYR

a) HPLC Shimadzu

Systemet består av følgende utstyr der alle enheter er fra Shimadzu corp., Kyoto, Japan:

Degasser:	Shimadzu DGU-20A5
Pumpe:	Shimadzu LC-20AD
Autosampler:	Shimadzu SIL-20AC
Kolonneovn:	Shimadzu CTO-20AC
Detektor:	Shimadzu SPD-M20A Diode Array
Kommunikasjonsmodul:	Shimadzu CBM-20A
Programvare:	Shimadzu LCsolution

- BETINGELSER FOR ADRENALINS METODE

Gradient:

Eluent A: Fosfatbuffer 0,015M pH 3,6

Eluent B: 70 % Metanol i Milli-Q-vann

Vaskeløsning:	70 % metanol i MilliQ-vann
Mobilfasehastighet:	1,3 ml/min
Skyllevæske pumpe:	10 % metanol i MilliQ-vann
Injektorvæske:	20 % metanol i MilliQ-vann
Injeksjonsvolum:	20 µl
Kolonne:	ZORBAX SB-C3 4.6 x 250mm, 5 µm
Kolonnetemperatur:	15 °C
Deteksjonsbølgelengde:	280 nm

- BETINGELSER FOR TETRAKAINS METODE

Mobilfase:	0,025 M fosfatbuffer pH6,9 30 % : metanol 70%
Mobilfasehastighet:	1 ml/min
Skyllevæske pumpe:	10 % metanol i Milli-Q-vann
Injektorvæske:	50 % metanol i Milli-Q-vann
Injeksjonsvolum:	20 µl
Kolonne:	SUPELCO [®] LC-8 250 mm × 4.6 mm, 5 µm
Kolonnetemperatur:	45°C
Deteksjonsbølgelengde:	310 nm

b) Spektrofotometer

Spektrofotometer mini UV1240, Shimadzu, Duisburg, Tyskland
(Bølgelengde 190-600 nm)

c) Autoklav

Vannautoklav E-10127, Mtachana, Barcelona, Spania

d) Analysevekt

Sartorius CPA225D-OC

e) pH-meter

pH-meter691, Metrohm Ltd., Herisau, Sveits

f) Milli-RO / Milli-Q-vannrensesystem

Milli-RO 8plus og Milli-Q plus, Millipore S.A., Molsheim, Frankrike

g) Whirlimixer™

Fisons Scientific Apparatus, Leicestershire, England

h) Ultralydbad

Branson 5510, Branson Ultrasonics b.v., Soest, Nederland

i) Pipetter

Diverse Finnpipetter 5µl-10ml, Thermo labsystems, Helsinki, Finland

j) Klimaskap

Termaks klimaskap, Solheimsviken, Norge

k) Kjøleskap

Bosch Cooler, Robert Bosch Hausgeräte GMBH, Stuttgart, Tyskland

l) Fryseboks

Sanyo medical freezer, MDF-435, Osaka, Japan

m) Filter 0,2 µm

Millex-FG, Millipore, Carrigwohill, Co. Cork, Irland

n) Filter 5 µm

Sterifix Pury, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Tyskland

o) Magnetrører

Rct BASIC, IKA Labortechnik, Tamro lab AS, Oslo, Norge

IKA®RET BASIC C Labortechnik, Tamro lab AS, Oslo, Norge

p) Sprøyter

BD Plastipak, BD New Jersey, USA

q) Hetteglass

Sterile hetteglass 20 ml klart glass Type 1, Saint-Gobain Desjonqueres

r) Propp til hetteglass

Klorbutylgummipropp 20 mm

Stopper 1730 PH 701/45/AS red brown/rotbraun

Ready for sterilization, West Pharmaceutical services (WPS)

s) Aluminium kapsler til hetteglass

Alukapsel Model 2025/7,5 sølv, West Pharmaceutical services (WPS)

t) Varmeskap

Heraeus instruments, D63450 Hanau

2.3 LØSNINGER

2.3.1 Utvikling av HPLC-analysemetode

Tabell 7: HPLC-løsninger for adrenalins metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Eluent A: Fosfatbuffer 0,015M, pH 3,6	Kaliumdihydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1M Milli-Q-vann	2,02 g 900 ml Ad pH 3,6 Ad 1000 ml
Eluent B: 70 % Metanol	Metanol Milli-Q-vann	70 deler 30 deler
Skyllevæske til Injektor	Metanol Milli-Q-vann	20 deler 80 deler
Skyllevæske til HPLC-pumpen	Metanol Milli-Q-vann	10 deler 90 deler

Tabell 8: Fortynningsvæske

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fortynningsvæske til fortynning av prøver og standarder	Natriummetabisulfitt Dinatriumedetat Milli-Q-vann Saltsyre 0,1 M Milli-Q-vann	20 mg 2 mg 900 ml Ad pH 4 Ad 1000 ml

Tabell 9: Løsninger til standardkurve for adrenalin

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Adrenalin 0,04 mg/ml stamløsning	Adrenalin tartrat Fortynningsvæske	18,19 mg 250 ml
Adrenalin 0,01 mg/ml	Adrenalin 0,04 mg/ml Fortynningsvæske	250 µl 750 µl
Adrenalin 0,02 mg/ml	Adrenalin 0,04 mg/ml Fortynningsvæske	500 µl 500 µl
Adrenalin 0,03 mg/ml	Adrenalin 0,04 mg/ml Fortynningsvæske	750 µl 250 µl

Tabell 10: HPLC-løsninger til tetrakains metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fosfat buffer 0,025M, pH 6,9	Kaliumdihydrogenfosfat	1,701 g
	Dikaliumhydrogenfosfat	2,177 g
	Milli-Q-vann	900 ml
	Kaliumhydroksid 1 M Milli-Q-vann	Ad pH 6,9 Ad 1000 ml
Mobilfase	Metanol	70 deler
	Fosfat buffer 0,025 M, pH 6,9	30 deler
Skyllevæske til Injektor	Metanol	50 deler
	Milli-Q-vann	50 deler
Skyllevæske til HPLC-pumpen	Metanol	10 deler
	Milli-Q-vann	90 deler

Tabell 11: Løsninger til standardkurve for tetrakain

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 32 µg/ml stamløsning	Tetrakainhydroklorid	18,20 mg
	Fortynningsvæske	500 ml
Tetrakain 8 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml	250 µl
	Fortynningsvæske	750 µl
Tetrakain 16 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml	500 µl
	Fortynningsvæske	500 µl
Tetrakain 24 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml	750 µl
	Fortynningsvæske	250 µl

2.3.2 Validering av HPLC-analysemetoder

Tabell 12: Linearitet adrenalins metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Adrenalin 40 µg/ml stamløsning	Adrenalin tartrat	18,19 mg
	Fortynningsvæske	250 ml
Adrenalin 30 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	750 µl
	Fortynningsvæske	250 µl
Adrenalin 25 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	625 µl
	Fortynningsvæske	375 µl
Adrenalin 20 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	500 µl
	Fortynningsvæske	500 µl
Adrenalin 15 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	375 µl
	Fortynningsvæske	625 µl
Adrenalin 10 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	250 µl
	Fortynningsvæske	750 µl
Adrenalin 5 µg/ml	Adrenalin 0,040 mg/ml	125 µl
	Fortynningsvæske	875 µl

Tabell 13: Linearitet tetrakains metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 32 µg/ml stamløsning	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Tetrakain 24 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	750 µl 250 µl
Tetrakain 20 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	625 µl 375 µl
Tetrakain 16 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	500 µl 500 µl
Tetrakain 12 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	375 µl 625 µl
Tetrakain 8 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	250 µl 750 µl
Tetrakain 4 µg/ml	Tetrakain 0,032 mg/ml Fortynningsvæske	125 µl 875 µl

Tabell 14: Validering spesifisitet, robusthet, interdagvariasjon, systempresisjon og prøvestabilitet for tetrakain og adrenalin metoder

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml (Stamløsning til prøver)	Adrenalartrarat Tetrakain hydroklorid Fortynningsvæske	36,40 mg 1,82 g 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml	Tetrakain hydroklorid Fortynningsvæske	1,82 g 100 ml
Adrenalin 0,2 mg/ml	Adrenalartrarat Milli-Q-vann	90,97 mg 250 ml
Adrenalin 40 µg/ml (Stamløsning til standarder)	Adrenalartrarat Fortynningsvæske	18,19 mg 250 ml
Adrenalin 20 µg/ml	Adrenalin 40 µg/ml Fortynningsvæske	500 µl 500 µl
Tetrakain 32 µg/ml (Stamløsning til standarder)	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Tetrakain 16 µg/ml	Tetrakain 32 µg/ml Fortynningsvæske	500 µl 500 µl
4-(butylamino)-benzoylsyre 0,602 mg/ml	4-(butylamino)- benzoylsyre Fortynningsvæske	60,20 mg 100 ml
Metylparaben 0,1 mg/ml	Metylparaben Milli-Q-vann	1,00 mg 10 ml
AAPH 10 mg/ml	2,2'-Azobis(2- methylpropionamidine) dihydrochloride Milli-Q-vann	100 mg 10 ml
Adrenokrom 9,77 mg/l	Adrenokrom Milli-Q-vann	9,77 mg 1000 ml
Adrenokromsulfonat 9,77 mg/l	Adrenokrom Fortynningsvæske	4,88 mg 500 ml

Tabellen fortsetter neste side

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Adrenalin + tetrakain +AAPH	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml AAPH 10 mg/ml Milli-Q-vann	1,0 ml 1,6 ml Ad 100 ml
Adrenalin + tetrakain + H ₂ O ₂	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml H ₂ O ₂ 30 %	9,0 ml 1,0 ml
Adrenalin + 4-(butylamino)- benzosyre	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml 4-(butylamino)- benzosyre 0,602 mg/ml Fortynningsvæske	0,1ml 0,1 ml Ad 100 ml
Adrenalin + tetrakain + Adrenokrom	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml Adrenokrom 9,77 mg/l Milli-Q-vann	0,1 ml 1 ml Ad 100 ml
Adrenalin + tetrakain + Adrenokromsulfonat	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml Adrenokromsulfonat 9,77 mg/l Milli-Q-vann	0,1 ml 1 ml Ad 100 ml
Adrenalin + tetrakain (pH 1)	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml HCl 1M Milli-Q-vann	25 ml Ad pH1 Ad 250 ml
Tetrakain (pH 1)	Tetrakain 16 mg/ml HCl 1M Milli-Q-vann	25 ml Ad pH1 Ad 250 ml
Adrenalin + tetrakain (pH 5,5)	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml NaOH 1M Milli-Q-vann	25 ml Ad pH 5,5 Ad 250 ml
Gammel tetrakain prøve 0,0133 mg/ml	Tetrakain 13,3 mg/ml Fortynningsvæske	100 µl Ad 100 ml
Adrenalin + AAPH	Adrenalin 0,2 mg/ml AAPH 10 mg/ml Milli-Q-vann	1 ml 1,6 ml Ad 10 ml
Adrenalin + H ₂ O ₂	Adrenalin 0,2 mg/ml H ₂ O ₂ 30 %	9 ml 1ml
Adrenalin + 4-(butylamino)- benzosyre	Adrenalin 0,2 mg/ml 4-But 0,602 mg/ml Fortynningsvæske	1,0ml 1,0ml Ad 10 ml
Adrenalin + Adernokrom	Adrenalin 0,2 mg/ml Adrenokrom 9,77 mg/l Milli-Q-vann	1,0 ml 1,0 ml Ad 10 ml
Adrenalin + Adernokromsulfonat	Adrenalin 0,2 mg/ml Adrenokromsulfonat 9,77 mg/l Milli-Q-vann	1,0 ml 1,0 ml Ad 10 ml
Tabellen fortsetter neste side		

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Adrenalin (pH 1,6)	Adrenalin 0,2 mg/ml HCl 1 M Milli-Q-vann	25 ml Ad pH1,6 Ad 250 ml
Adrenalin (pH 11,2)	Adrenalin 0,2 mg/ml NaOH 1 M Milli-Q-vann	25 ml Ad pH11,2 Ad 250 ml
Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Gammel tetrakain prøve 0,0133 mg/ml spiket med adrenalin 0,02 mg/ml	Tetrakain 13,3 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml Fortynningsvæske	100 µl 10 ml Ad 100ml
Adrenalin + tetrakain + adrenokrom + adrenokromsulfonat + 4-(butylamino)- benzosyre + metylparaben	Adrenalin 0,2 mg/ml + tetrakain 16 mg/ml Adrenokrom 9,77 mg/l Adrenokromsulfonat 9,77 mg/l 4-(butylamino)- benzosyre 0,602 mg/ml Metylparaben 0,1 mg/ml Milli-Q-vann	1 ml 1 ml 1 ml 1 ml 1 ml Ad 10 ml

Tabell 15: Robusthet adrenalins metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fosfat buffer 0,015M, pH 3,7	Kaliumdihydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1M Milli-Q-vann	2,02 g 900 ml Ad pH 3,7 Ad 1000 ml
Fosfat buffer 0,015M, pH 3,5	Kaliumdihydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1M Milli-Q-vann	2,02 g 900 ml Ad pH 3,5 Ad 1000 ml
Fosfat buffer 0,016 M, pH 3,6	Kaliumdihydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1M Milli-Q-vann	2,177 g 900 ml Ad pH 3,6 Ad 1000 ml
Fosfat buffer 0,014 M, pH 3,6	Kaliumdihydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1M Milli-Q-vann	1,905 g 900 ml Ad pH 3,6 Ad 1000 ml

Tabell 16: Robusthet tetrakains metode

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Fosfat buffer 0,025M, pH 7,1	Kaliumdihydrogenfosfat Dikaliumhydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1 M Milli-Q-vann	1,701 g 2,177 g 900 ml Ad pH 7,1 Ad 1000 ml
Fosfat buffer 0,025M, pH 6,7	Kaliumdihydrogenfosfat Dikaliumhydrogenfosfat Milli-Q-vann Fosforsyre 1 M Milli-Q-vann	1,701 g 2,177 g 900 ml Ad pH 6,7 Ad 1000 ml
Mobilfase, 72 % MeOH	Metanol Fosfat buffer 0,025M pH 6,9	72 deler 28 deler
Mobilfase, 68 % MeOH	Metanol Fosfat buffer 0,025M pH 6,9	68 deler 32 deler

2.3.3 Preformulering

Tabell 17: pH-stabilitetskurve for tetrakain

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 17,77 mg/ml Stamløsning til prøver	Tetrakain hydroklorid WFI	10,12 g 500ml
Tetrakain 0,032 mg/ml Stamløsning til standarder	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Tetrakain 16 mg/ml pH 2	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	45 ml Ad pH 2 Ad 50 ml
Tetrakain 16 mg/ml pH 3	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	45 ml Ad pH 3 Ad 50 ml
Tetrakain 16 mg/ml pH 4	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	45 ml Ad pH 4 Ad 50 ml
Tetrakain 16 mg/ml pH 5	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	45 ml Ad pH 5 Ad 50 ml
Tetrakain 16 mg/ml pH 6	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	45 ml Ad pH 6 Ad 50 ml

Tabell 18: Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakainstabilitet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 17,77 mg/ml Stamløsning til prøver	Tetrakain hydroklorid WFI	10,12 g 500ml
Natriummetabisulfitt 200 mg/ml	Natriummetabisulfitt WFI	4,00 g 20 ml
Tetrakain 0,032 mg/ml Stamløsning til standarder	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 1,0 %	Tetrakain 17,77 mg/ml Natriummetabisulfitt 200 mg/ml HCl 1 M WFI	180 ml 10 ml Ad pH 4 Ad 200 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,5 %	Tetrakain 17,77 mg/ml Natriummetabisulfitt 200 mg/ml HCl 1 M WFI	180 ml 5 ml Ad pH 4 Ad 200 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,2 %	Tetrakain 17,77 mg/ml Natriummetabisulfitt 200 mg/ml HCl 1 M WFI	180 ml 2 ml Ad pH 4 Ad 200 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,005 %	Tetrakain 17,77 mg/ml Natriummetabisulfitt 200 mg/ml HCl 1 M WFI	180 ml 50 µl Ad pH 4 Ad 200 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0 %	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	180 ml Ad pH 4 Ad 200 ml

Tabell 19: Effekt av EDTA på tetrakainstabilitet

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 17,77 mg/ml Stamløsning til prøver	Tetrakain hydroklorid WFI	10,12 g 500ml
EDTA 20 mg/ml	EDTA WFI	0,4 g 20 ml
Tetrakain 0,032 mg/ml Stamløsning til standarder	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,10 %	Tetrakain 17,77 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	90 ml 5 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,005 %	Tetrakain 17,77 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	90 ml 0,5 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,0025 %	Tetrakain 17,77 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	90 ml 50 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,0002 %	Tetrakain 17,77 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	90 ml 10 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0 %	Tetrakain 17,77 mg/ml HCl 1 M WFI	90 ml Ad pH 4 Ad 100 ml

Tabell 20: Effekter av natriummetabisulfitt, EDTA og adrenalin på stabiliteten av tetrakain

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 64 mg/ml Stamløsning til prøver	Tetrakain hydroklorid WFI	36,41 g 500ml
Adrenalin 20 mg/ml Stamløsning til prøver	Adrenalintartrat WFI	0,73 g 20 ml
Tetrakain 0,032 mg/ml Stamløsning til standarder	Tetrakainhydroklorid Fortynningsvæske	18,20 mg 500 ml
Adrenalin 0,040 mg/ml Stamløsning til standarder	Adrenalintartrat Fortynningsvæske	18,19 mg 250 ml
EDTA 20 mg/ml	EDTA WFI	0,4 g 20 ml
Natriummetabisulfitt 20 mg/ml	Natriummetabisulfitt WFI	0,4 g 20 ml
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,005 %	Tetrakain 64 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 250 µl Ad pH 4 Ad 100 ml

Tabellen fortsetter neste side

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 16 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,10 %	Tetrakain 64 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 5,0 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,0002 %	Tetrakain 64 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 10 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,01 %	Tetrakain 64 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 500 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0,005 % Natriummetabisulfitt 0,05 %	Tetrakain 64 mg/ml EDTA 20 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 250 µl 2,5 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml EDTA 0 % Natriummetabisulfitt 0 %	Tetrakain 64 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,005 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml 250 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,10 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml 5 ml Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml EDTA 0,0002 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml 10 µl Ad pH 4 Ad 100 ml

Tabellen fortsetter neste side

Ferdig løsning	Innhold	Mengde
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml EDTA 0,01 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml 500 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml Natriummetabisulfitt 0,05 % EDTA 0,005 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml Natriummetabisulfitt 20 mg/ml EDTA 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml 2,5 ml 250 µl Ad pH 4 Ad 100 ml
Tetrakain 16 mg/ml Adrenalin 0,2 mg/ml Natriummetabisulfitt 0 % EDTA 0 %	Tetrakain 64 mg/ml Adrenalin 20 mg/ml HCl 1 M WFI	25 ml 1,0 ml Ad pH 4 Ad 100 ml

3. METODER

3.1 UTVIKLING AV HPLC-ANALYSEMETODER FOR ADRENALIN OG TETRAKAIN

3.1.1 Valg av HPLC-kolonne

Valg av kolonne var utfordrende fordi preparatet inneholder to forskjellige stoffer, adrenalin og tetrakain i svært forskjellig konsentrasjon (adrenalin 0,2mg/ml, tetrakain 16mg/ml). Det bidro også til å gjøre valget komplisert at begge stoffer danner mange nedbrytningsprodukter.

For å finne egnet kolonne ble det tatt utgangspunkt i litteratur som beskrev analysemetoder for adrenalin og tetrakain.

Tabell 21 viser kolonner som ble forsøkt brukt samt egenskapene til stasjonærfasene.

Tabell 21: Kolonner som ble forsøkt, samt egenskaper til stasjonærfase

Type kolonne	Egenskaper for stasjonærfase
C18, 150 mm × 4.6 mm, 3 µm	Stasjonærfase (CH ₂) ₁₇ -CH ₃ (octadecyl) med hydrofob overflate. Egnert til omvendt-fase-kromatografi
Synergi Fusion-RP, 150 mm × 4.6 mm, 4 µm	C-18 fase blandet med polar fase. Gir balansert polar og hydrofob selektivitet
LC-DP, 100 cm × 4.6 mm, 5 µm	LC-DP inneholder en difenyl (-C ₆ H ₅) ₂ bundet stasjonærfase som gir større selektivitet for aromatiske grupper
LC-8, 150 mm × 4.6 mm, 5 µm	Stasjonærfase (CH ₂) ₇ -CH ₃ (octyl) med hydrofob overflate egnert til omvendt-fase-kromatografi
HILIC, 150 mm × 4.6 mm, 2.7 µm	“ <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> ”, stasjonærfasen har polar overflate og kolonnen benyttes til separasjon av polare
Cyano, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm	En lang cyano (R-CN) kolonne, stasjonærfasen er hydrofoil og kolonnen kan benyttes i normalfasekromatografi
Cyano, 30 mm × 4.6 mm, 5 µm	Et kort cyano (R-CN) kolonne, stasjonærfasen er hydrofoil og kolonnen kan benyttes i normalfasekromatografi
LC-8, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm	En lang C8 kolonne med bedre separasjonsevne, stasjonærfase (CH ₂) ₇ -CH ₃ (octyl) med hydrofob overflate egnert til omvendt-fase-kromatografi
SB-C3, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm	Stasjonærfase (CH ₂) ₂ -CH ₃ med hydrofob overflate egnert til både omvendt-fase-kromatografi og normalfasekromatografi

3.1.2 Valg av mobilfase

Under utviklingen av metoden ble det brukt eluenter med varierende innhold av organisk modifikator (fra 0 % til 100 %). Som organisk modifikator ble det forsøkt brukt acetonitril og metanol, hver for seg og i blanding. For å forbedre mobilfasen ble følgende tilsetninger forsøkt brukt:

- Eddiksyre 0,1 %
- Natriumheptaensulfonat
- Trietylamin

Buffersaltkonsentrasjoner mellom 0,0025-0,5 M ble forsøkt bruk.

Mobilfasene ble forsøkt på ulike kolonner og ble vurdert ut fra om de kunne gi en egnet elueringstid for analytten samtidig som adrenalins topp var skilt fra tetrakain.

De viktigste funnene er presentert i Tabell 44-52 (se 7. vedlegg).

3.1.3 Valg av mobilfasehastighet

Mobilfasehastigheter mellom (0,5-2,5 ml/min) ble forsøkt brukt. Mobilfasehastigheten ble undersøkt med hensyn til retensjonstid, separasjon, selektivitet og analysetid (se vedlegg, Tabell 44-52).

3.1.4 Valg av temperatur

Effekten av temperaturen i kolonneovnen ble undersøkt mellom 12-50 °C. Effekten på retensjonstid, separasjon og selektivitet ble vektlagt (se vedlegg, Tabell 44-52).

3.1.5 Valg av eluent B

For analysemetoder der det benyttes gradient eluering (ved analyse av adrenalin) vil tetrakain ofte sitte igjen på kolonnen. Dette må vaskes av for hver analyse (med en "eluent B"). Sammensetningen av vaskeløsning ble undersøkt med hensyn til kortest mulig analysetid og effektiviteten ved utvasking av tetrakain, tilsetningsstoffer og nedbrytningsprodukter.

3.1.6 Valg av deteksjonsmetode og bølgelengde

Siden adrenalin og tetrakain og deres vanligste nedbrytningsprodukter har god UV-absorbans (over 190 nm) velges det en UV-deteksjonsmetode. HPLC-systemet er utstyrt med "Photodiode Array (PDA)" detektor. Detektoren kan gi et fullt UV-spektrum av toppene. Ved hjelp av et UV-spektrofotometer ble det tatt UV-spektrum av begge stoffene i vandig løsning, hvor absorbansen ble registrert som funksjon av bølgelengde (Figur 7 og Figur 11).

Adrenalin har maksimum UV-absorbans ved bølgelengder 198, 220 og 280 nm, og tetrakain har maksimum UV-absorbans ved bølgelengder 200, 230, og 310 nm (Figur 7 og Figur 11). For deteksjon av adrenalin ble det valgt bølgelengder på 220 og 280 nm, og for deteksjon av tetrakain ble det valgt bølgelengde 310 nm.

3.2 BESKRIVELSE AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN

I forsøk der annet ikke er spesifisert, ble det til HPLC-analysene av adrenalin benyttet en gradient beskrevet i Tabell 22. Systembetingelser for adrenalinanalysemetoden er beskrevet i Tabell 23.

Eluent A består av 100 % 0,015 M fosfatbuffer pH 3,6 (Tabell 7) og benyttes til eluering av adrenalin.

Eluent B består av 70 % (v/v) metanol i Milli-Q-vann (Tabell 7) og benyttes til utvasking av tetrakain.

Tabell 22: Gradient adrenalinanalysemetode (eluent A= fosfatbuffer 0,015M pH 3,6 eluent B= 70 % MeOH i Milli-Q-vann)

Tid	Eluent	Prosess
0,01- 5 min	100 % A	eluering av adrenalin
5,01-7 min	100 % A til 100 % B	påbegynne utvasking av tetrakain
7-19 min	100 % B	utvasking av tetrakain
19-21 min	100 % B til 100 % A	ekviblering av kolonne
21-25 min	100 % A	ekviblering av kolonne

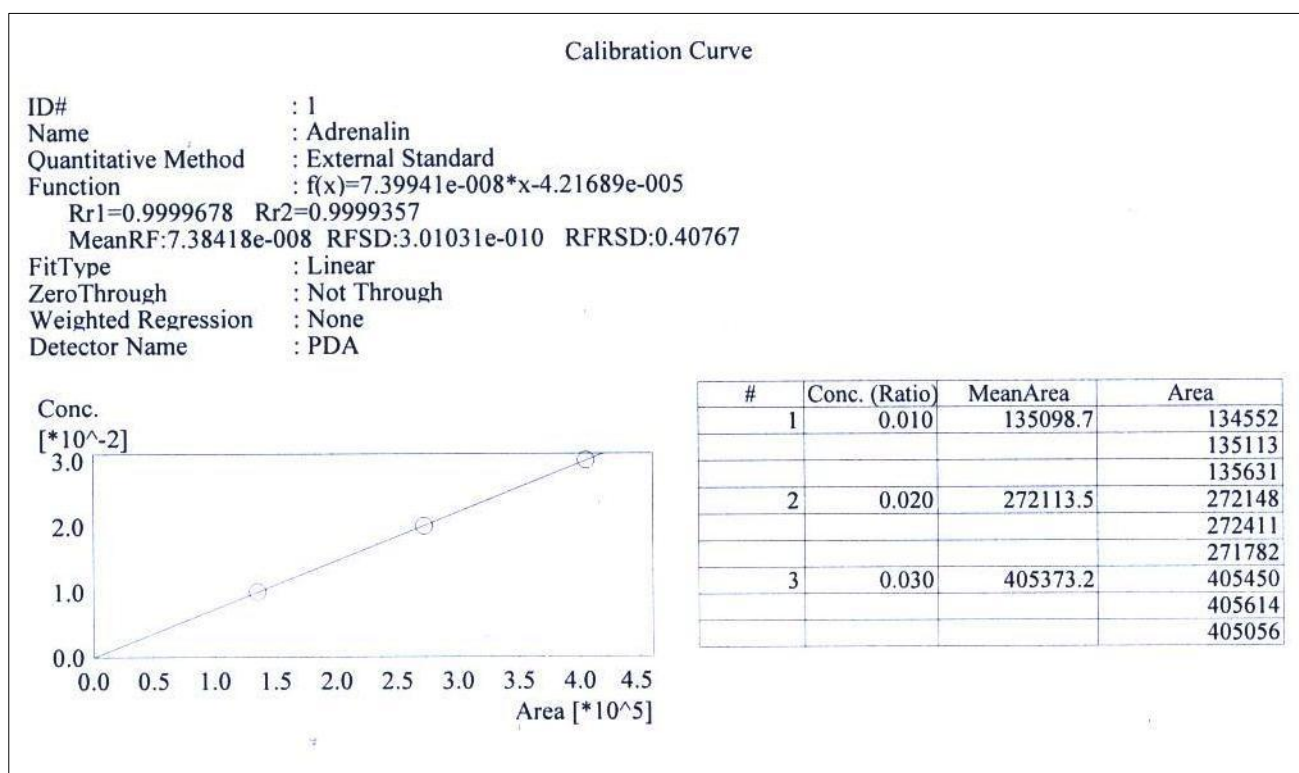
Tabell 23: Systembetingelser for adrenalinanalysemetoden

Kolonne	ZORBAX SB-C3 4.6 x 250mm, 5 µm
Kolonneovn temperatur	15 °C
Mobilfse hastighet	1,3 ml/min
Detektor (UV)	PDA
Deteksjonsbølgelengde	280 nm
Analysetid	25 min
Skyllvæske til pumpe	10 % metanol i MilliQ-vann
Injeksjonsvolum	20 µl
Injektorvæske:	20 % metanol i MilliQ-vann

En 20 % (v/v) metanol i Milli-Q-vann skyllevæske til injektor (Tabell 7) og en skyllevæske til pumpe med 10 % (v/v) metanol i Milli-Q-vann ble brukt til HPLC-systemet (Tabell 7). Prøver og standarder ble fortynnet i fortynningsvæske (Tabell 8) om ikke annet er skrevet. Bufferen ble blandet på magnetrører, pH-justert med fosforsyre 1 M til pH 3,6 og filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Mobilfase og skyllevæsker ble blandet på magnetrører og degasset på ultralydbad i 15 minutter.

Adrenalin ble normalt kvantifisert mot en trepunkts standardkurve av adrenalin der konsentrasjonene av adrenalin var 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml og 0,03 mg/ml (n=3, $r^2 = 0,999$) (Figur 14).

Standarder ble laget ved utpipettering av stamløsning og fortynningsvæske direkte i HPLC-injektorglass (Tabell 9).



Figur 14: Trepunkts standardkurve av adrenalin der konsentrasjonene av adrenalin var 0,01 mg/ml, 0,02 mg/ml og 0,03 mg/ml (n=3)

3.3 BESKRIVELSE AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN

I forsøk der annet ikke er spesifisert, ble det til HPLC-analysene for bestemmelse av tetrakain benyttet en mobilfase bestående av 70 % (v/v) metanol og 30 % fosfatbuffer 0,025 M, pH 6,9 (Tabell 10). Systembetingelser for tetrakainanalysemetoden er beskrevet i Tabell 24.

Skyllevæsken til injektoren bestod av 50 % (v/v) metanol i Milli-Q-vann og skyllevæsken til pumpen bestod av 10 % (v/v) metanol i Milli-Q-vann (Tabell 10).

Prøver og standarder ble fortynnet i en fortynningsvæske (Tabell 8).

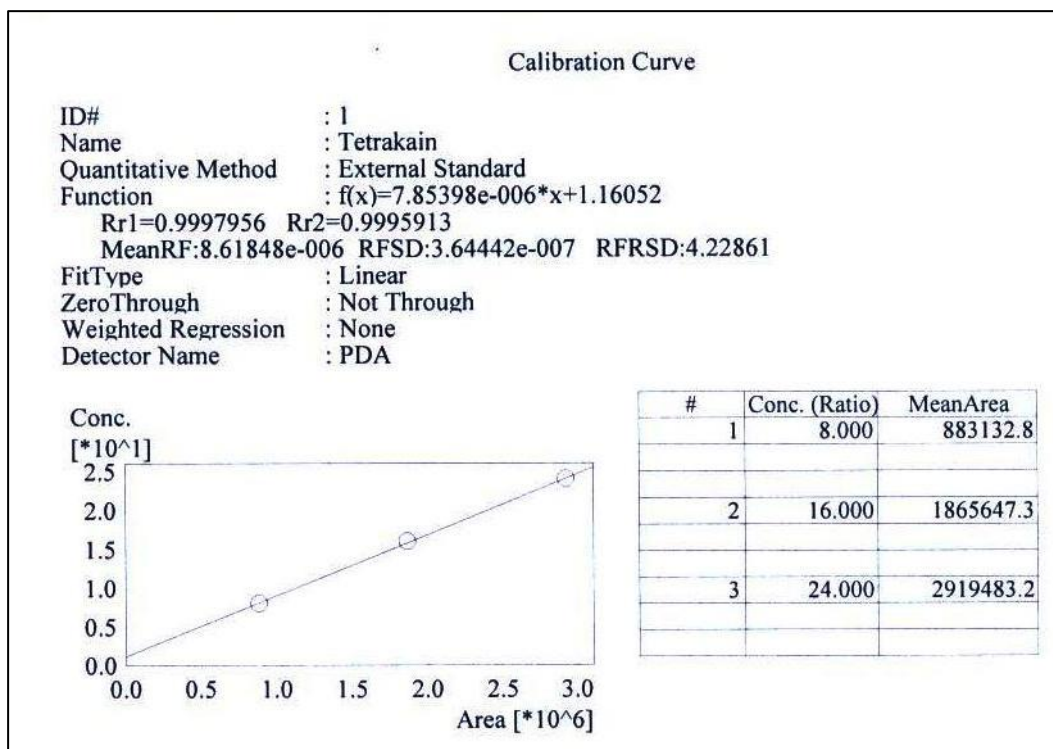
Bufferen ble blandet på magnetrører, pH justert med kaliumhydroksid 1 M til pH 6,9 og filtrert gjennom et 0,45 µm filter. Mobilfase og skyllevæsker ble blandet på magnetrører og degasset på ultralydbad i 15 minutter.

Tabell 24: Systembetingelser for tetrakainanalysemetoden

Kolonne	SUPELCOSIL [®] LC-8 250 mm × 4.6 mm, 5 µm
Mobilfase	0,025 M fosfatbuffer pH6,9 30 % : metanol 70%
Kolonneovn temperatur	45 °C
Mobilfsehastighet	1 ml/min
Detektor (UV)	PDA
Deteksjonsbølgelengde	310 nm
Analysetid	15 min
Skyllevæske til pumpe	10 % metanol i MilliQ-vann
Injeksjonsvolum	20 µl
Skyllevæsken til injektor	50 % metanol i MilliQ-vann

Prøver med normal konsentrasjon av tetrakain (16 mg/ml) ble fortynnet 1000 ganger og kvantifisert mot en trepunkts standardkurve der konsentrasjonene av tetrakain var 8 µg/ml, 16 µg/ml og 24 µg/ml (n=3, $r^2 = 0,999$) (Figur 15).

Standarder ble laget ved utpipettering av stamløsning og fortynningsvæske direkte i HPLC-injektorglass (Tabell 11).



Figur 15: Trepunkts standardkurve der konsentrasjonene av tetrakain var 8 µg/ml, 16 µg/ml og 24 µg/ml (n=3)

3.4 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN

For å fastsette akseptable grenser for de ulike parametrene ble det tatt utgangspunkt i internasjonale anbefalinger (International Conference of Harmonization 2005) samt gjeldende praksis innen farmasøytisk industri (Shabir 2002).

3.4.1 Linearitet

Metodens lineære respons ble undersøkt ved å analysere 7 løsninger av adrenalin i et område på 20 til 150 % av konsentrasjonen i 10 ganger fortynnet originalpreparat (adrenalin 0,2 mg/ml-tetrakain 16 mg/ml).

Valideringen av linearitet ble utført ved å ta utgangspunkt i en stamløsning av adrenalin 40 µg/ml (Tabell 12). Prøvene ble deretter laget ved å fortynne denne stamløsningen med fortynningsvæske. Topparealet ble benyttet til å bestemme konsentrasjonen og Shimadzu LcSolution programvare ble benyttet til å bestemme beste regresjonslinje ved minste kvadrats metode.

De aktuelle konsentrasjonene som ble benyttet ved valideringen av linearitet var: 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, 15 µg/ml, 20 µg/ml, 25 µg/ml og 30 µg/ml (n= 1).

Det ble foretatt tre prøveinjeksjoner fra hvert prøveglass.

En regresjonslinje med regresjonskoeffisient (r^2) på 0,998 eller bedre ville tilsi at metoden hadde en akseptabel linearitet.

3.4.2 Nøyaktighet

Nøyaktigheten ble dokumentert indirekte gjennom validering av linearitet, presisjon og spesifisitet.

3.4.3 Deteksjonsgrense (LOD)

Fortynningsrekken av adrenalin laget under linearitetstesten ble brukt til å bestemme deteksjonsgrensen, LOD, for stoffet i metoden. Deteksjonsgrensen ble satt til den verdien der signalet for adrenalin var tre ganger høyere enn støyutslaget i grunnlinjen.

3.4.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Fortynningsrekken av adrenalin laget under linearitetstesten ble brukt til å bestemme kvantifiseringsgrensen, LOQ, for stoffet i metoden. Kvantifiseringsgrensen ble satt til den verdien der signalet for adrenalin var ti ganger høyere enn støyutslaget i grunnlinjen.

3.4.5 Bruksområde ("Range")

Egnethet for bruksområde ble undersøkt over 50 % - 150 % av normalkonsentrasjonen. Presisjon, angitt ved relativt standard avvik ved topp- (150 %) og bunnpunkt (50 %) sammen med lineariteten for hele området ble brukt som målparametre på bruksområde.

Resultatene ble beregnet ut fra seks injeksjoner av hver konsentrasjon (brukt i standardkurve under linearitetstesting).

Et relativt standard avvik for de seks injeksjonene på 2 % eller lavere ville være akseptabelt for presisjonen ved topp og bunnpunkt i standardkurven. En regresjonskoeffisient (r^2) for lineariteten på 0,998 eller høyere ville bli ansett som akseptabel.

3.4.6 Systempresisjon

Systempresisjon ble undersøkt ved å konsentrasjonsbestemme én prøve med adrenalin (20 µg/ml) ved hjelp av seks prøveinjeksjoner fra ett og samme injektorglass. Det ble laget en adrenalin stamløsning (40 µg/ml). Prøven til undersøkelsen ble laget ved å fortynne denne stamløsningen med fortynningsvæske (Tabell 12). Prøve ble injisert fortløpende 6 ganger fra samme prøveglass. Relativt standardavvik for de seks injeksjonene ble beregnet.

Et relativt standard avvik på under 1% ansees normalt som akseptabelt.

3.4.7 Interdagvariasjon

Metodens interdagvariasjon ble undersøkt ved å fordele en prøveløsning av adrenalin-tetrakain 0,2 mg/ml-16 mg/ml i fortynningsvæske i 42 endorfrør (Tabell 14). Seks av rørene ble analysert på samme dag og resten ble frosset ned og analysert på fem forskjellige dager over et tidsrom på to uker. Relativ standardavvik for resultatene de seks dagene ble beregnet og brukt som mål på interdagvariasjon.

Et relativt standardavvik på 3% eller lavere skulle regnes som akseptabelt i denne valideringen.

3.4.8 Intradagvariasjon

Metodens intradagvariasjon ble undersøkt ved å bruke datamaterialet fra valideringen av metodens interdagvariasjonstest. Et relativt standardavvik for de seks prøvene analysert på en og samme dag på inntil 2% ville bli ansett som akseptabelt.

3.4.9 Spesifisitet

Prøver av adrenalin 0,2 mg/ml og tetrakain 16mg/ml og adrenalin 0,2 mg/ml - tetrakain 16 mg/ml ble degradert ved:

- 1) å redusere pH til 1 og 1,6
- 2) å heve pH til 5,5 og 6 og 11,2
- 3) å tilsette oksidasjonsfremmende agens H_2O_2 ,
- 4) å varmebehandle løsningen ved 70 °C i varmeskap i 5 døgn.

Det ble laget prøver av adrenalin og dets vanligste nedbrytningsprodukter, adrenokrom og adrenokromsulfonat, og tetrakain og dets vanligste nedbrytningsprodukt

4-(butylamino)-benzoic acid. Det ble også laget prøver som inneholdt metylparaben (se fullstendig oversikt over prøver brukt under spesifisitetstesting i Tabell 14).

Prøvene ble oppbevart i klimaskap ved 25 °C og 60 % relativfuktighet i 7 dager, fortynnet 10 ganger og deretter analysert ved hjelp av HPLC. Kromatogrammene ble undersøkt for å se hvorvidt metoden separerte virkestoff og degraderingsprodukter.

En oppløsning på 1,0 mellom adrenalins topp og andre topper skulle ville bli regnet som akseptabelt.

3.4.10 Robusthet

Metodens robusthet ble undersøkt ved å analysere adrenalin 0,2 mg/ml - tetrakain 16 mg/ml ved forhold som avviker noe fra det normale. pH i bufferen ble endret med $\pm 0,1$ enhet fra normalen på 3,6, konsentrasjonen av buffersalt ble variert med $\pm 0,001M$ fra normalen på 0,015M, mobilfasehastigheten ble variert med $\pm 0,1$ ml/min fra normalen på 1,3 mg/ml og kolonnens temperatur ble variert med ± 1 °C fra normalen på 15 °C (Tabell 15).

Til valideringen ble det benyttet nedbrutte prøver fra valideringen av spesifisitet samt en gammel tetrakain prøve (utløpsdato 21.04.2007, batchnr.504764) som var brukt under spesifisitets testing (se prøver fra Tabell 14).

Metoden ville bli regnet som robust dersom ingen topper ble eluert inn i adrenalins topp under noen av de undersøkte betingelsene.

3.4.11 Prøvestabilitet

Prøver av adrenalin 20 µg/ml (Tabell 14) ble laget og overført til seks HPLC-injektorglass. De ble analysert rett etter at de var laget samt etter 120 timer. Mellom analysetidspunktene ble alle septum byttet og prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 5 ± 3 °C. Nye standarder ble laget før hvert analysetidspunkt. Prosentvis endring ble beregnet.

En variasjon mellom de to prøvetidspunktene på inntil 2 % ville bli betraktet som akseptabelt.

3.5 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN

3.5.1 Linearitet

Metodens lineære respons ble undersøkt ved å analysere 7 løsninger av tetrakain i et område på 20 til 150 % av konsentrasjonen i 1000 ganger fortynnet originalpreparat (adrenalin 0,2 mg/ml-tetrakain 16 mg/ml).

Valideringen av linearitet ble utført ved å ta utgangspunkt i en stamløsning av tetrakain 32 µg/ml (Tabell 13). Prøvene ble deretter laget ved å fortynne denne stamløsningen med fortynningsvæske. Topparealet ble benyttet til å bestemme konsentrasjonen og Shimadzus LCSolution programvare ble benyttet til å bestemme beste regresjonslinje ved minste kvadrats metode.

De aktuelle konsentrasjonene som ble benyttet ved valideringen av linearitet var:

4 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 16 µg/ml, 20 µg/ml og 24 µg/ml 32 µg/ml (n=3).

Det ble foretatt tre prøveinjeksjoner fra hvert prøveglass.

En regresjonslinje med regresjonskoeffisient (r^2) på 0,998 eller bedre ville tilsi at metoden hadde en akseptabel linearitet.

3.5.2 Nøyaktighet

Nøyaktigheten ble dokumentert indirekte gjennom validering av linearitet, presisjon og spesifisitet.

3.5.3 Deteksjonsgrense (LOD)

Fortynningsrekken av tetrakain laget under linearitetstesten ble brukt til å bestemme deteksjonsgrensen, LOD, for stoffet i metoden. Deteksjonsgrensen ble satt til den verdien der signalet for tetrakain var tre ganger høyere enn støyutslaget i grunnlinjen.

3.5.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Fortynningsrekken av tetrakain laget under linearitetstesten ble brukt til å bestemme kvantifiseringsgrensen, LOQ, for stoffet i metoden. Kvantifiseringsgrensen ble satt til den verdien der signalet for tetrakain var ti ganger høyere enn støyutslaget i grunnlinjen.

3.5.5 Bruksområde ("Range")

Egnethet for bruksområde ble undersøkt over 50 % - 150 % av normalkonsentrasjonen. Presisjon ved 50 % og 150 % ble dokumentert under validering av interdag-presisjon der ble det brukt en trepunkts standardkurve (normalt 50-150 % av målkonsentrasjon). Til denne standardkurven er det knyttet krav til linearitet ($r^2 > 0,998$) og presisjon for hvert punkt (maksimalt avvik for hvert punkt er ± 2 %).

Linearitet (r^2) og relativt standard avvik (RSD) for standardkurvene (brukt under validering av interdag-presisjon) ble brukt for å validere bruksområde.

Et gjennomsnittlig relativt standard avvik på 2 % eller lavere og en gjennomsnittlig regresjonskoeffisient (r^2) for lineariteten på 0,998 eller høyere ville bli ansett som akseptabel.

3.5.6 Systempresisjon

Systempresisjon ble undersøkt ved å konsentrasjonsbestemme én prøve med tetrakain (16 $\mu\text{g/ml}$) ved hjelp av seks prøveinjeksjoner fra ett og samme injektorglass. Det ble laget en tetrakain stamløsning (16 mg/ml). Prøven til undersøkelsen ble laget ved å fortynne denne stamløsningen 1:1000 med fortynningsvæske (Tabell 14). Prøve ble injisert fortløpende seks ganger fra samme prøveglass. Relativt standardavvik for de seks injeksjonene ble beregnet.

Et relativt standard avvik på under 1% ansees normalt som akseptabelt.

3.5.7 Interdagvariasjon

Metodens interdagvariasjon ble undersøkt ved å fordele en prøveløsning av adrenalin-tetrakain 0,2 mg/ml-16 mg/ml i fortynningsvæske i 42 endorfrør (Tabell 14). Seks av rørene ble analysert på samme dag og resten ble frosset ned og analysert på fem forskjellige dager over et tidsrom på to uker. Relativ standardavvik for resultatene de seks dagene ble beregnet og brukt som mål på interdagvariasjon.

Et relativt standardavvik på 3% eller lavere skulle regnes som akseptabelt i denne valideringen.

3.5.8 Intradagvariasjon

Metodens intradagvariasjon ble undersøkt ved å bruke datamaterialet fra valideringen av metodens interdagvariasjonstest. Et relativt standardavvik for de seks prøvene analysert på en og samme dag på inntil 2% ville bli ansett som akseptabelt.

3.5.9 Spesifisitet

Prøver av adrenalin 0,2 mg/ml og tetrakain 16mg/ml og adrenalin 0,2 mg/ml - tetrakain 16 mg/ml ble degradert ved:

- 1) å redusere pH til 1,
- 2) å tilsette oksidasjonsfremmende agens H₂O₂ og AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride),
- 3) å varmebehandle løsningen ved 70 °C i varmeskap i 5 døgn.

Det ble laget prøver av adrenalin og dets vanligste nedbrytningsprodukter, adrenokrom og adrenokromsulfonat, og tetrakain og dets vanligste nedbrytningsprodukt

4-(butylamino)-benzosyre. Det ble også laget prøver som inneholdte metylparaben (se fullstendig oversikt over prøver brukt under spesifisitetstesting i Tabell 14).

Prøvene ble oppbevart i klimaskap ved 25 °C og 60 % relativfuktighet i 7 dager, fortynnet 1000 ganger og deretter analysert ved hjelp av HPLC. Kromatogrammene ble undersøkt for å se hvorvidt metoden separerte virkestoff og degraderingsprodukter.

En oppløsning på 1,0 mellom adrenalins topp og andre topper skulle ville bli regnet som akseptabelt.

3.5.10 Robusthet

Metodens robusthet ble undersøkt ved å analysere adrenalin 0,2 mg/ml - tetrakain 16 mg/ml prøver ved forhold som avviker noe fra det normale. pH i bufferen ble endret med $\pm 0,2$ enhet fra normalen på 6,9 og mobilfasesammensetning i forhold til andel metanol ble endret ± 2 % fra normalen på 70 % (Tabell 16).

Til valideringen ble det benyttet nedbrutte prøver fra valideringen av spesifisitet samt en gammel tetrakain prøve (utløpsdato 21.04.2007, batchnr.504764) som var brukt under spesifisitets testing (Tabell 14).

Metoden ville bli regnet som robust dersom ingen topper ble eluert inn i adrenalins topp under noen av de undersøkte betingelsene.

3.5.11 Prøvestabilitet

Prøver av tetrakain 16 $\mu\text{g/ml}$ (Tabell 14) ble laget og overført til seks HPLC-injektorglass. De ble analysert rett etter at de var laget samt etter 120 timer. Mellom analysetidspunktene ble alle septum byttet og prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved 5 ± 3 °C. Nye standarder ble laget før hvert analysetidspunkt. Prosentvis endring ble beregnet.

En variasjon mellom de to prøvetidspunktene på inntil 2 % ville bli betraktet som akseptabelt.

3.6 PREFORMULERINGSSTUDIER FOR TETRAKAIN OG TETRAKAIN-ADRENALIN

3.6.1 pH-stabilitetskurve for tetrakain

For å bestemme optimal pH for tetrakain - der tetrakain har høyest stabilitet - ble det laget pH-justerte løsninger av stoffet (Tabell 17). Løsninger av tetrakain (16 mg/ml) med pH-verdier på 2, 3, 4, 5, og 6 (n=3) ble analysert etter 24 timers oppbevaring i romtemperatur. Prøvene ble deretter autoklavert (121 °C i 16 minutter) og analysert på nytt. Til slutt ble prøvene hensatt ved 70 °C i varmeskap til tydelig missfarging kunne registreres (5 døgn) og deretter ble alle prøvene analysert kvantitativt ved hjelp av HPLC (etter varmebehandling prosesser, alle tetrakain prøvene ble fortynnet 1:1000 med fortynningsvæske og deretter analysert ved hjelp av HPLC).

3.6.2 Undersøkelse av misfarging ved absorbansmåling, visuell kontroll og mikroskopering

Rene tetrakainløsninger er fargeløse og har ingen absorpsjon for bølgelengder over 400 nm. For å få en indikasjon på sammenhengen mellom nedbrytning av tetrakain og graden av misfarging for varmebehandlede og pH-justerte tetrakain-prøver, ble absorbansen til prøver brukt under pH-stabilitetsundersøkelsen (3.6.1) målt i området 190-600 nm. Absorbansen ved 400 nm og 500 nm ble registrert som indikasjon på misfarging.

For å karakterisere utfelling i form av polymerisering og dannelse av uløselige partikler, ble løsningene observert med mikroskopi og partikkelstørrelsesområde registrert.

3.6.3 Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakainstabilitet - innledende forsøk

For å undersøke effekten av natriummetabisulfitt på stabiliteten av tetrakain ble det laget prøveløsninger av tetrakain (16mg/ml) med konsentrasjoner av natriummetabisulfitt på 1, 0.5, 0.2 og 0.005 % (w/v) (n = 12) (Tabell 18).

Prøveløsningene ble fylt på 20 ml hetteglass og utsatt for varmebehandling på to måter:

- 1) 10 ganger autoklivering (121 °C, 16 minutter) over to dager
- 2) Varmebehandling i varmeskap ved 70 °C i 5 dager

Alle prøveløsninger ble fortynnet og deretter analysert kvantitativt rett etter varmebehandling. Absorbansen til alle varmebehandlede prøver ble målt ved 400 og 500 nm ved hjelp av spekterofotometri.

3.6.4 Effekt av EDTA på tetrakain stabilitet - innledende forsøk

For å undersøke effekten av EDTA på stabiliteten av tetrakain ble det laget prøveløsninger av tetrakain (16mg/ml) med EDTA konsentrasjoner på 0.1, 0.005, 0.0025 og 0.0002 % (w/v) (n= 6) (Tabell 19)

Prøvene ble varmebehandlet ved 70 °C i fem dager. Alle prøveløsninger ble fortynnet og analysert kvantitativt rett etter varmebehandling

Absorbansen til alle varmebehandlede prøver ble målt ved 400 og 500 nm ved hjelp av spekterofotometri.

3.6.5 Effekter av natriummetabisulfitt, EDTA og adrenalin på stabiliteten av tetrakain

Det ble laget prøveløsninger av tetrakain (16 mg/ml) som inneholdt varierende mengde EDTA, natriummetabisulfitt og adrenalin. Konsentrasjonene av EDTA ble variert mellom 0,01 og 0,0002 % (w/v), konsentrasjonen av natriummetabisulfitt ble variert mellom 0,1 % og

0,005 % (w/v), og konsentrasjonen av adrenalin var enten 0 eller 0,2 mg/ml når stoffet var tilsatt (Tabell 20).

Sammensetningen av enkeltløsningene var som følger:

- Tetrakain (16 mg/ml)
- Tetrakain (16 mg/ml), natriummetabisulfitt 0,1 % (w/v)
- Tetrakain (16 mg/ml), natriummetabisulfitt 0,005 % (w/v)
- Tetrakain (16 mg/ml), EDTA 0,01 % (w/v)
- Tetrakain (16 mg/ml), EDTA 0,0002 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), natriummetabisulfitt 0,05 % (w/v), EDTA 0,005 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml) natriummetabisulfitt 0,1 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml) natriummetabisulfitt 0,005 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml), EDTA 0,01 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml), EDTA 0,0002 % (w/v)
- Tetrakain (16mg/ml), adrenalin (0,2 mg/ml), natriummetabisulfitt 0,05 % (w/v), EDTA 0,005 % (w/v)

Det ble laget prøveløsninger med vekselvis høye og lave konsentrasjoner av de tre tilsetningene EDTA, natriummetabisulfitt og adrenalin for slik å kunne finne effekten av de ulike stoffene, for seg og i blanding. Resultatene ble analysert ved hjelp av en statistisk dataanalyse program (The Unscrambler®, som verktøy for multivariat dataanalyse)

Alle ferske prøveløsningene ble fortynnet og analysert kvantitativt rett etter fremstilling.

Deretter ble de varmebehandlet på følgende måte:

- 1) Autoklaving (121 °C i 16 minutter)
- 2) Varmebehandling i varmeskap ved 70 °C i 10 dager
- 3) Varmebehandling i varmeskap ved 70 °C i 20 dager
- 4) Varmebehandling i varmeskap ved 70 °C i 30 dager

Etter hvert ledd i varmebehandlingsprogrammet ble tre hetteglass av hver type løsning fortynnet og deretter analysert kvantitativt ved hjelp av HPLC. Absorbansen til alle varmebehandlede prøver ble målt ved 400 og 500 nm ved hjelp av spekterofotometri.

3.7 METODER FOR MULTIVARIAT DATAANALYSE

3.7.1 Generelt om multivariat dataanalyse

Mange fenomener er komplekse, og det er relativt sjelden at et reelt fenomen kan beskrives ved hjelp av en modell der én årsak gir én virkning. Ofte kan et fenomen beskrives gjennom en rekke responser (for eksempel *stabilitet, farge, utfelling* etc.) og disse responsene kan være avhengig av en mengde variabler (for eksempel *temperatur, pH, innhold av ulike tilsetningsstoffer* etc.). Sammenhengen mellom faktorer og responser blir fort uoversiktlig. Multivariat analyse er statistiske teknikker som kan bli brukt til å behandle kompleks informasjon på en måte som gjør at de viktigste sammenhengene blir lettere å se.

3.7.2 PLS-metoder og NIPALS-algoritme

En grunnleggende metode innenfor multivariat dataanalyse er PCA (**P**ri**n**cipal **C**omponent **A**nalysis). Dette er en utforskende statistisk metode – en metode som ofte brukes for å se på data på hensiktsmessig måte. PCA tar utgangspunkt i et sett med objekter og til disse objektene er det knyttet et sett med variable. Disse variablene kan projiseres i et multidimensjonalt rom: Til et objekt A kan det for eksempel være knyttet et sett variable V1, V2 og V3. Disse vil ha bestemte koordinater i det multidimensjonale rommet. Et annet objekt, B, vil gjerne ha andre koordinater. Antall variabler er ikke begrenset til tre, men kan være høyere. PCA som analysemetode kan hjelpe en med å finne den aksen der variasjonen i datamaterialet er størst (ofte kalt første prinsipalkomponent, PC1). Deretter finner metoden aksen med nest størst variasjon (PC2) (denne vil alltid stå vinkelrett på PC1)

PCA brukes primært til å *se på* data. Dersom det er ønske om å undersøke sammenhenger mellom variabler og responser benyttes andre multivariate metoder, for eksempel PCR. PCR (*P*ri**n**cipal *C*omponent *R*egression) gjør først en PCA-analyse av variablene (X) for deretter å relatere disse til responser (Y). PLS regresjon (*P*artial *L*east *S*quares regresjon) ligner PCR, men ved PLS modeller ses både variablene (X) og responsene (Y) samtidig. I PLS vil responsene få større innvirkning på de modellene som lages og modeller kan også lages med hensyn på den eller de responsene det er interessant å studere. PLS er derfor en multivariat metode som har fått betydelig utbredelse.

I denne studien er programvaren The Unscrambler X benyttet. For å lage PLS-analyser er NIPALS-algoritmen brukt for å beregne de viktigste faktorene (disse i praksis kan tolkes som de viktigste komponentene). NIPALS står for *N*on-linear *I*terativ *P*artial *L*east *S*quares og

algoritmen egner seg til bruk når det finnes manglende verdier eller når man kun er interessert i å beregne de første, og viktigste, faktorene (Esbensen 2000).

3.7.3 Tolkning av analyseresultater ved hjelp av The Unscrambler® som verktøy for multivariat dataanalyse

Datamaterialet fra enkelte forsøk har blitt analysert ved hjelp av The Unscrambler X. The Unscrambler X har flere plott som kan brukes til tolkning av resultater. De viktigste av disse er beskrevet i det følgende:

- *"2-dimensional (bivariate) scatter plot"*

Dette er et helt enkelt plott som viser to variabler i forhold til hverandre. Plottet benyttes for å gi et innledende inntrykk av eventuelle sammenhenger.

- *"X- and Y-loading plot"*

Plottet er et resultat av en PLS-analyse og viser variabler (X) og responser (Y) i et faktorkoordinatsystem (for eksempel viktigste faktor, Faktor 1, langs én akse og neste viktigste faktor, Faktor 2, langs den andre).

Variabler og responser som ligger nær hverandre i plottet, og på samme side av origo, samvarierer, mens variabler og responser som ligger langt fra hverandre vil være negativt korrelert.

- *"Explained residual variance"*

"Explained residual variance" viser andel av den totale variansen som er beregnet for hver faktor i modellen. En forklart varians på 70 % betyr at 70 % av variasjonen i datamaterialet er forklart av det aktuelle antallet faktorer, mens gjenværende 30 % ikke er forklart. Dette kan være støy. Plottet gir et bilde av hvor mye av et datasett modellen forklarer (Esbensen 2000).

4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.1 UTVIKLING AV HPLC-ANALYSEMETODER FOR ADRENALIN OG TETRAKAIN

Arbeidet med å utvikle analysemetoden startet med det for øyet å oppnå en metode der både adrenalin og tetrakain kunne analyseres samtidig, på samme kolonne, og under samme systembetingelser.

Både omvendtfase og normalfasekromatografiske metoder ble benyttet under metodeutviklingsarbeidet.

Tetrakain ($pK_a = 8,39$ og $\log P = 3,749 \pm 0,541$) og adrenalin ($pK_a = 9,60 \pm 0,10$ og $\log P = -0,539 \pm 0,352$) har store strukturelle forskjeller i forhold til polaritet og dermed fettløselighet. Både adrenalin og tetrakain er amfifile molekyler, det vil si at de har både hydrofobe og hydrofile egenskaper. Både adrenalin og tetrakain er positivt ladet i pH området mellom 2 til 6. De to stoffene har følgelig både forskjeller og likheter.

En analysemetodes spesifisitet kan optimaliseres både gjennom modifisering av mobilfasens hydrofile og hydrofobe egenskaper og gjennom valg av riktig kolonne.

Med hensyn til analyttens fysikalsk-kjemiske egenskaper (polaritet, molekylstørrelse og funksjonelle grupper) og basert på tidligere arbeid ble forskjellige kolonner prøvd ut. Ulike mobilfasesammensetninger og systembetingelser ble forsøkt for de ulike kolonnene.

Det viste seg å være svært vanskelig å oppnå en metode der både adrenalin og tetrakain kunne analyseres samtidig, på samme kolonne, og under samme systembetingelser.

Det var flere grunner til dette. For det første hadde adrenalin og tetrakain vidt forskjellig polaritet og molekylstørrelse og dermed forskjellige retensjoner på mange forskjellige kolonner;

- Ved bruk av omvendt-fase-kromatografi (hydrofob stasjonærfase og vandig mobilfase) virker stort sett upolar (hydrofob) interaksjon mellom analytt og stasjonærfase som separasjonsprinsipp. Når det ble benyttet en mobilfase med lav andel organisk modifikator (polar mobilfase), hadde adrenalin – som er et relativt lite og polart molekyl – lite interaksjon med den hydrofobe stasjonær-fasen og dermed lite retensjon. Tetrakain som er mindre polart ble retardert kraftig (for eksempel ved bruk av C-18 kolonne, se tabell 44 forsøk no.1-6). Ved å øke

mobilfasets andel av organisk modifikator (mer upolar mobilfase) reduserer tetrakainets retensjon mens adrenalin ikke ble retardert i det hele tatt.

- Ved bruk av normalfasekromatografi (hydrofil stasjonærfase med polar overflate og upolar organisk mobilfase) benyttes det polar interaksjon mellom analytt og stasjonærfase som separasjonsprinsipp. Når det benyttes en mobilfase med lav andel organisk modifikator (polar mobilfase), tetrakain som er en relativt stor og upolar molekyl har lite interaksjon med den hydrofile stasjonærfasen og dermed lite retensjon mens adrenalin som er polar retarderes litt sterkere (for eksempel ved bruk av HILIC kolonne, se tabell 48 forsøk no.33-44). Ved å øke mobilfasets andel av organisk modifikator (mer upolar mobilfase) øker adrenalinetts retensjon mens tetrakain retarderes mindre.

Prosjektet ble ytterligere komplisert da det viste seg at tetrakain ga opphav til mange degraderingsprodukter som i mange analyseoppsett interfererte med adrenalin ved 220 nm (Figur 16 og 17) og ved 280 nm. Ekstra komplisert ble det siden tetrakain foreligger i mye høyere konsentrasjon i preparatet enn adrenalin. Tetrakains nedbrytningsprodukter ville derfor ofte interferere med adrenalins topp – selv når tetrakain var brutt ned i svært liten grad.

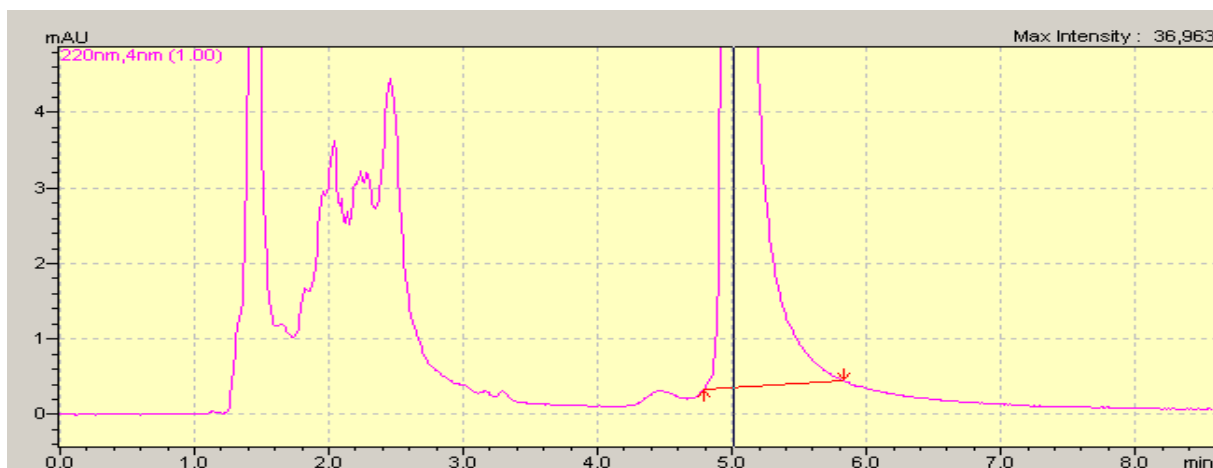
På grunn av disse utfordringene ble det bestemt å utvikle to forskjellige metoder for analyse av adrenalin og tetrakain hver for seg.

4.1.1 Utvikling av HPLC-analysemetode for adrenalin

I det videre arbeidet med å utvikle analysemetode for adrenalin ble det fokusert på å optimalisere retensjonstid og separasjon med hensyn på adrenalin. Det ble tatt utgangspunkt i separasjonsprinsippet som benyttes i omvendt-fase-kromatografi. Bruk av mobilfaser med ulikt innhold av organisk modifikator (acetonitril 0-100 % og metanol 0-100 %) ble forsøkt brukt. Nærmest et godt resultat kom vi ved bruk av 0,005M fosfatbuffer pH3,6:MeOH (15:85 % v/v) mobilfase på en 25 cm C8 kolonne ved 45 °C og en deteksjonsbølgelengde på 220 nm (se tabell 51 forsøk no.79).

Dette var en tilsynelatende velfungerende metode (Figur 16) og valideringsarbeidet ble satt i gang.

Under validering av metodens spesifisitet ble det imidlertid oppdaget interferens mellom adrenalins topp og en uskjent topp (Figur 16 og 17).



Figur 16: Kromatogram av et adrenalin prøve (adrenalin ved $R_t=5\text{min}$) i en analysemetode som ble begynt validert, men siden forkastet på grunn av interferens. Prøven er analysert ved hjelp av adrenalinanalysemetode (tabell 51 forsøk no. 79)



Figur 17: En varmedegradert tetrakainprøve analysert ved hjelp av den forkastede adrenalinmetoden (Figur 16). Interfererende topper kan sees ved adrenalins retensjonstid($R_t=5\text{min}$). Prøven er analysert ved hjelp av adrenalinanalysemetode (tabell 51 forsøk no. 79)

Valideringsarbeidet ble stanset og arbeidet med utvikling av ny adrenalinmetode ble satt i gang. I utviklingsarbeidet ble det brukt ulike kolonner (C18, Synergi Fusion-RP, LC-DP, LC-8, HILIC, Cyano, SB-C3) forskjellige mobilfasesammensetninger (0-100 % metanol, 0-100 % acetonitril, fosfatbuffer med forskjellige konsentrasjon og pH-verdier) ulike temperatur (12-50 °C) ulik væskehastighet (0,5-3 ml/min) samt forskjellige typer gradienter (se tabell 44-52).

Tabell 44-52 viser et utvalg av de viktigste resultatene. Til sammen ble det gjort ca 1000 forsøk for å finne de optimale analysebetingelsene.

For å optimalisere retensjonstiden ble det brukt mobilfasesammensetninger tilsatt forskjellige modifikatorer:

- For å unngå irreversible adsorpsjon og haledannelse er det ikke uvanlig å tilsette baser til en mobilfase, for eksempel trietylamin eller ammoniakk, ved separasjon av baser. Syrer som eddiksyre eller maursyre kan tilsettes mobilfaser for å hindre haledannelse av syrer.
- Natriumheptaensulfonat tilsettes mobilfaser for å dekke restsilanolgrupper på stasjonærfasen og dermed gjøre stasjonærfasen mer upolar. Natriumheptaensulfonat kan også danne ionepar med analytten og øke retensjonen på en upolar stasjonærfase. I mange tilfelle er det vanskelig å gi en eksakt forklaring på separasjonen fordi flere prosesser kan medvirke.

Tilsetning av ovennevnte modifikatorer til mobilfasen var ikke til nytte og ønsket resultat ble ikke oppnådd.

Bufferens saltkonsentrasjon kan påvirke både retensjon og separasjonen. Økt buffersaltkonsentrasjon fører til økt mobilfasepolaritet og dermed retensjonen som er basert på upolar interaksjon mellom analytt og stasjonærfase økes og vice versa. Store salt konsentrasjoner har i tillegg en ugunstig effekt i form av utfelling og tetting av HPLC-pumpe og instrument kanaler.

Det viser seg at bufferens pH (i pH områder 3-7) er av lite betydning når det gjelder adrenalins retensjonstid og metodens selektivitet. Det fordi adrenalin molekylet ($pK_a = 9,60 \pm 0,10$) er ionisert (positivt ladet) i dette pH-området. De fleste silikabaserte kolonnematerialer har oftest en stabil pH omfang som ligger mellom 2 til 7,5. Bufferens pH skal velges med hensyn til analyttens stabilitet og systemets toleranse overfor pH.

Mobilfasehastigheten ble undersøkt med hensyn til effekten på retensjonstid, separasjon, selektivitet og analysetid for adrenalin (se tabell 44-52). Instrumentelle utfordringer begrenser valg av mobilfasehastigheten. Mobilfasehastigheter større enn 2,5-3,0 ml/min fører til økt trykk ($P > 250$ bar) og dermed systemstans. Mobilfasehastigheter lavere enn 0,5 ml/min

anbefales ikke (i følge systemspesifikasjoner for HPLC-apparaturen) på grunn av økt fluktuasjon i retensjonstider og dermed redusert metoderobusthet.

Fordeler og ulemper ved bruk av de forskjellige HPLC-kolonner under metodeutviklingsarbeidet var som følger:

- Ved bruk av C18-kolonne ble tetrakain ikke eluert og adrenalin hadde dårlig retensjon (se tabell 44 forsøk 1-6). Dette skyldes sannsynligvis kolonnens betydelige hydrofobisitet (upolar C-18 kjede) der tetrakain ($\log P = 3.749 \pm 0.541$) har sterk interaksjon med kolonne materialet og derfor retarderes sterkt mens adrenalin som er et relativt hydrofilt molekyl ($\log P = -0.539 \pm 0.352$) retarderes lite.
- Ved bruk av en Synergi Fusion-RP-kolonne, hadde adrenalin akseptabel retensjon, men tetrakain ble ikke eluert (se tabell 45 forsøk 7-8). Dette skyldes sannsynligvis kolonnematerialets hydrofobe egenskaper, der tetrakain har sterkere interaksjon og retarderes mer enn adrenalin.
- Ved bruk av LC-DP-kolonne hadde adrenalin akseptabel retensjon men toppen interfererte med ukjent topp og tetrakain ble ikke eluert (se tabell 46 forsøk 9-11). Dette skyldes sannsynligvis kolonnematerialets hydrofobe egenskaper der tetrakain retarderes sterkt.
- Ved bruk av LC-8, 15 cm-kolonne hadde adrenalin akseptabel retensjon, men toppen var ikke ren nok og tetrakain ble ikke eluert under samme betingelser (se tabell 47 forsøk no.12-32). Dette skyldes sannsynligvis kolonnematerialets hydrofobe egenskaper der adrenalin på grunn av sine hydrofile egenskaper retarderes lite mens tetrakain som er mer hydrofob retarderes sterkere.
- Ved bruk av HILIC-kolonne (HILIC = Hydrofil interaksjonsvæskrokromatografi), hadde adrenalin enten lite eller alt for stor retensjon med asymmetrisk topp og interferens med ukjent topp (se tabell 48 forsøk 33-44). Dette skyldes sannsynligvis kolonnematerialets hydrofile egenskaper der adrenalin som en amfifil molekyl retarderes enten sterk eller ikke i det hele tatt.
- Ved bruk av Cyano-kolonne (reversfase materiale), hadde adrenalintoppen enten interfererte med ukjent topp eller dårlig retensjon (se tabell 49 forsøk 45-69 og tabell 50 forsøk 70-77). Dette skyldes sannsynligvis kolonnens hydrofile egenskaper der adrenalin som er amfifil retarderes lite av kolonnematerialet.
- Ved bruk av LC-8, 25 cm-kolonne, hadde adrenalin akseptabel retensjon, men toppen var ikke ren nok (dette ble oppdaget under metodevalideringsarbeidet, se tabell 51 forsøk no.79) og tetrakain toppen var skarp og symmetrisk med akseptabel retensjon

og renhet (se tabell 51 forsøk no.78). Denne kolonnen ble valgt for videre arbeid med tetrakain-metodeutvikling (se tabell 51 forsøk no.78-110). C-8 materialet har passende hydrofobisitet for retensjon av tetrakain.

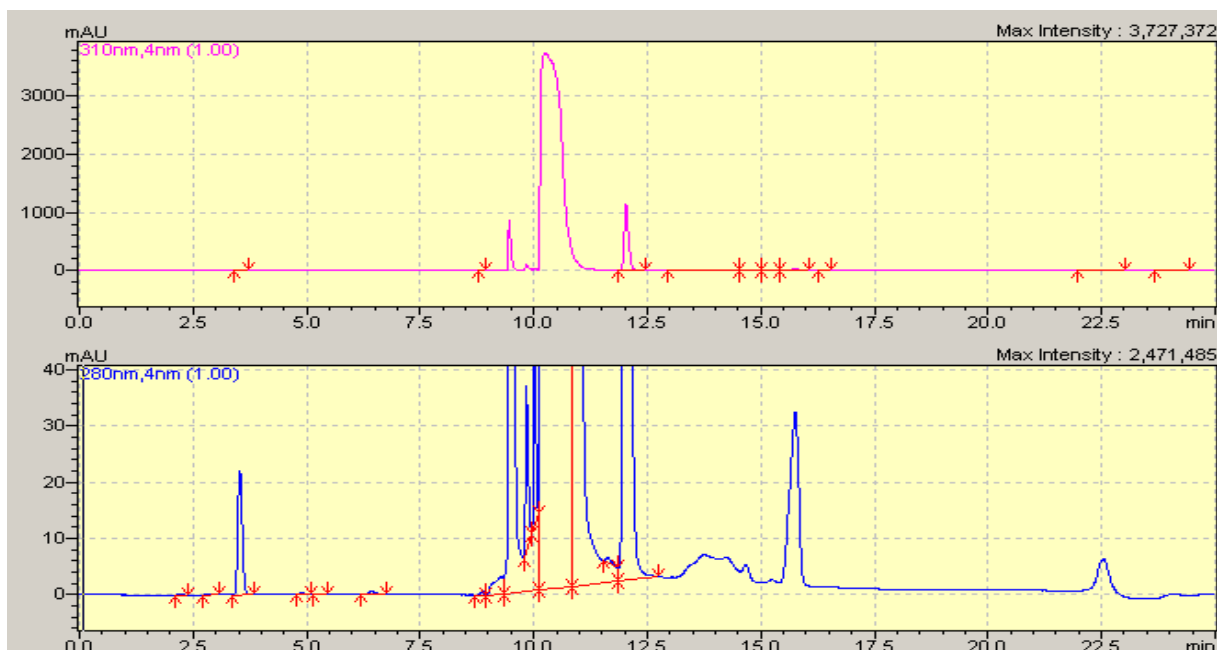
Nærmest et godt resultat for adrenalin kom man ved bruk av en 25 cm C3 kolonne (se tabell 52 forsøk no.111-123).

På den valgte 25 cm C3 kolonnen kan ekstreme mobilfasesammensetninger brukes (det vil si 100 % vandig, og 100 % organisk mobilfase). Ved bruk av en 100 % fosfatbuffer som elueringsmiddel har adrenalin passende retensjon og tetrakain elueres ikke i det hele tatt (se tabell 52 forsøk no. 123). Det på grunn av C-3 materialets lave hydrofobisitet der adrenalin har en passende interaksjon med kolonnematerialet. Den lave elueringsstyrken (100 % fosfatbuffer) gir en optimal retensjon for adrenalin og tetrakain som er mer hydrofob enn adrenalin, elueres ikke i det hele tatt. Ved økende andel organisk modifikator (metanol) elueres tetrakain raskere, det på grunn av økt mobilfasets elueringsstyrke (mer upolar mobilfase). Dette danner et godt grunnlag for å utvikle en gradient analysemetode basert på to forskjellige mobilfaser - en for analyse av adrenalin og en for utvasking av tetrakain.

Analysebetingelser som mobilfasehastighet, buffersalkkonsentrasjon og kolonnetemperatur viser seg å være av stor betydning (se tabell 52 forsøk no. 111-123).

- Økt mobilfasehastighet reduserer, som forventet, adrenalins retensjonstid og utvasking av tetrakain går også raskere.
- Med økt kolonnetemperatur reduserer adrenalins retensjonstid. Dette skyldes antagelig redusert interaksjon mellom analytt og stasjonærfase, samt redusert viskositet av mobilfasen (se tabell 52 forsøk 117-121).
- Med økt buffersalkkonsentrasjon øker adrenalins retensjonstid og vice versa. Dette skyldes kanskje at økt mobilfasepolaritet gir opphav til mer upolar interaksjon og dermed større affinitet mellom analytt og stasjonærfase (se tabell 52 forsøk no. 113-117).

Disse analyse- og systembetingelsene ble optimalisert i en gradient elueringsmetode. Betingelsene skulle være tilpasset eluering av adrenalin med passende retensjonstid og topprenhet, samtidig skulle tetrakain vaskes av kolonnen med gradienten. Videre arbeid med metodevalidering ble satt i gang for en utvalgt metode (se tabell 52 forsøk no. 123) Et normalchromatogram for den valgte metoden er vist i Figur 18.



Figur 18: Kromatogram av et gammel tetrakain prøve spiket med adrenalin, adrenalin toppen observeres ved $R_t=3,5$ min og tetrakain ved $R_t=10,5$. Prøven er analysert ved hjelp av adrenalinanalysemetode (tabell 52 forsøk no. 123)

4.1.2 Kvalitativ analyse, identifisering av adrenalin

For identifisering av analytten er det tatt opp et UV-spektrum, for adrenalin hvor absorbansen til stoffet registreres som funksjon av bølgelengde (Figur 7, UV-spekter for adrenalin i vandig løsning). Figuren viser at adrenalin har maksimum UV-absorbans ved bølgelengder 198, 220, og 280nm.

Forskjellige stoffer har forskjellige UV-spektre. Et ukjent stoff kan identifiseres ved UV-spektroskopi dersom spekteret av det ukjente stoffet er identisk med et referansespektrum for et kjent stoff.

Et contour -plot fra PDA-detektoren viser spekter for et bredt bølgelengdeområde for eluert mobilfase over tid (Figur 19 og 20). Et slikt spekter er egnet til å identifisere adrenalin.

Figur 19 viser adrenalintoppen ved $R_t=3,5$ min hvor maksimum absorbans observeres ved 198, 220 og 280 nm. Toppen er ren og nærliggende toppe interfererer ikke.

Adrenalin av høy renhet (> 98 %) fra anerkjent leverandør (Sigma) elueres med samme retensjonstid.

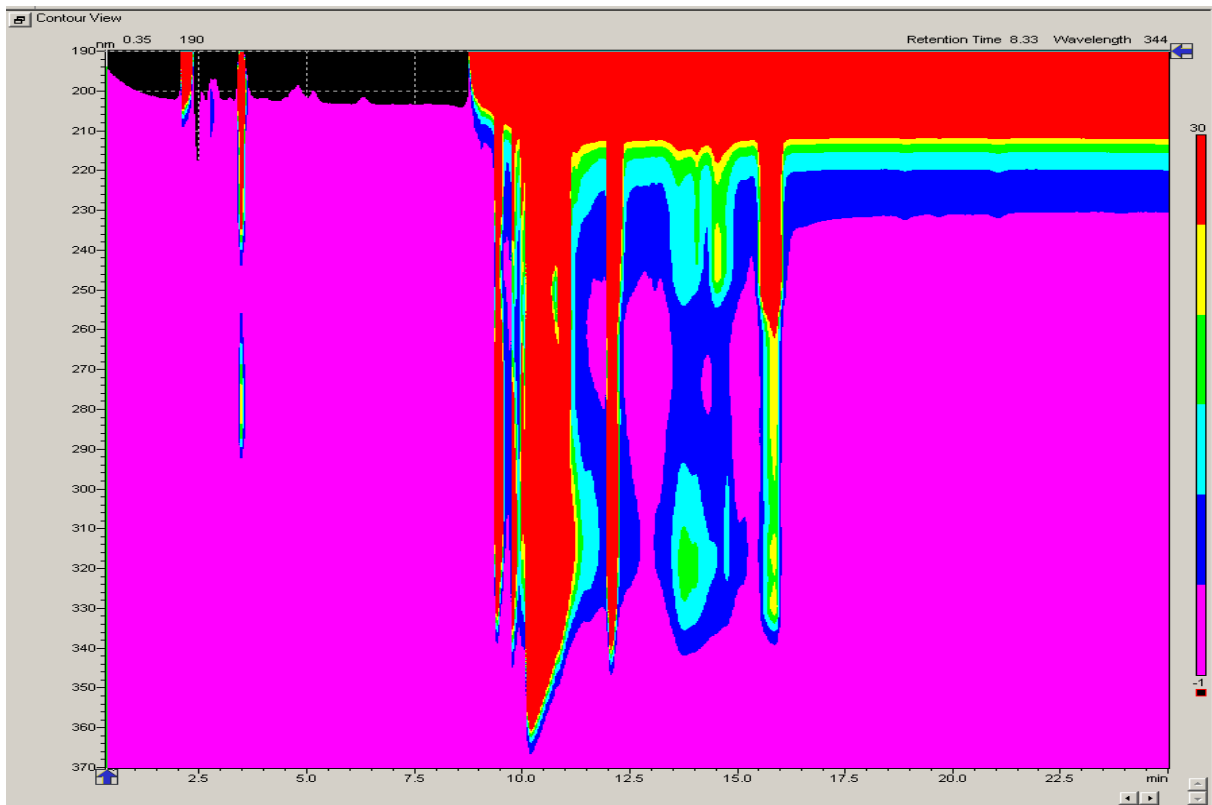


Figur 19: PDA-kromatogram (contour-plot, utsnitt) for en gammel tetrakainprøve spiket med adrenalin, adrenalintoppen observeres ved $R_t=3,5$ min og har et maksimum for UV-absorbans ved 280 nm. Prøven er analysert ved hjelp av adrenalinanalysemetode (tabell 52 forsøk no. 123).

Figur 20 viser samme kromatogram i full størrelse. Prøven er en gammelt tetrakainprøve spiket med adrenalin (tetrakain 13,3 mg/ml, gammel tetrakain preparat, utløpsdato 21.04.2007, batchnr.504764, spiket med adrenalin 0,2 mg/ml).

Adrenalintoppen kan sees ved $R_t = 3,5$ min mens tetrakaintoppen elueres ved $R_t = 10$ min – de to toppene er fullstendig separert fra hverandre. Tetrakaintoppen har et maksimum UV-absorbans ved 310 nm – som er typisk for tetrakain. Tetrakain av høy renhet (98 %) fra anerkjent leverandør (Sigma) elueres med samme retensjonstid ($R_t = 10$ min)

Kromatogramet (Figur 20) viser også de mange hydrofobe nedbrytningsproduktene som elueres med den hydrofobe eluenten (eluent B, brukt i adrenalin metoden).



Figur 20: PDA-kromatogram (contour plot, full størrelse) for en gammel tetrakainprøve spiket med adrenalin. Adrenalintoppen observeres ved $R_t = 3,5$ min og har et maksimum for UV-absorbans ved 280 nm. Tetrakaintoppen observeres ved $R_t = 10,25$ min og har et maksimum for UV-absorbans ved 310 nm. Fettløselige tilsetningsstoffer og nedbrytningsprodukter elueres etter ca 9-16 min (utvasking med eluent B, adrenalin analysemetode). Prøven er analysert ved hjelp av adrenalinanalysemetode (tabell 52 forsøk no. 123).

4.1.3 Utvikling av HPLC-analysemetode for tetrakain

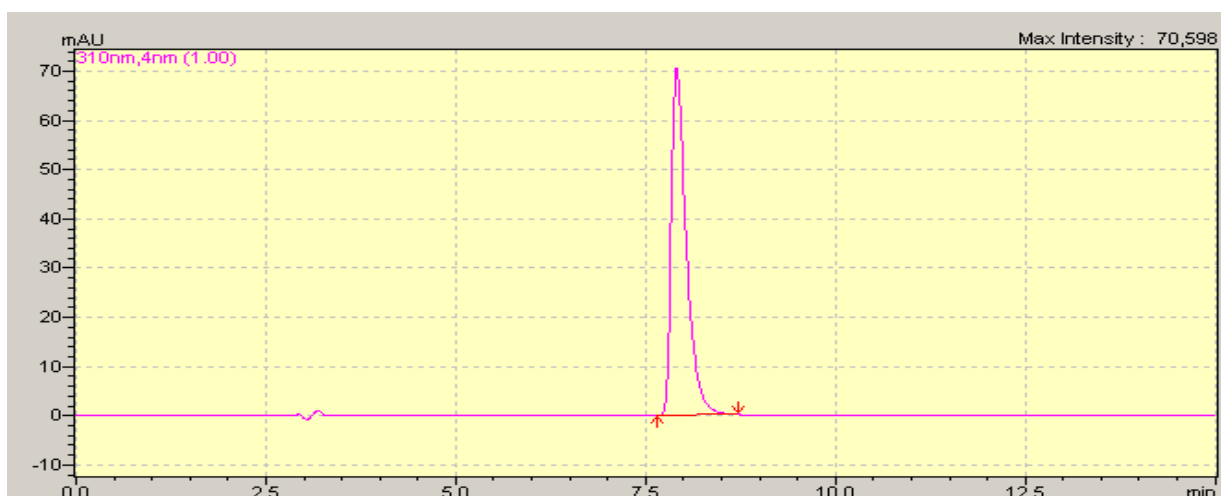
Under utviklingen av en analysemetode for tetrakain ble det fokusert på å oppnå god separasjon og optimal retensjonstid for kun tetrakain. Mobilfaser med ulikt innhold av organisk modifikator ble forsøkt brukt (acetonitril 5-100 %, metanol 5-100 %) (Tabell 44-51) Beste elueringsforhold ble oppnådd med en mobilfase bestående av 0,025M fosfatbuffer pH6,9:MeOH (30:70 % v/v) og en 25 cm C8 kolonne ved 45 °C og en mobilfasehastighet på 1 ml/min og deteksjon ved 310 nm (se tabell 51 forsøk no. 78).

De analyse- og systembetingelsene som har størst effekt på tetrakaineluering viser det seg å være kolonnetemperatur, andel organiskfase og bufferens pH (se tabell 47 forsøk no. 12-32 og tabell 51 forsøk no. 78-110).

- Med økt andel organisk modifikator reduserer tetrakains retensjonstid og vice versa (se tabell 44-51). Dette skyldes antagelig en reduksjon av upolare interaksjoner mellom analytt og stasjonærfase.
- Med økning i bufferens pH, reduserer tetrakains retensjonstid. Dette kan kanskje skyldes deprotonering av restsilanolgrupper og dermed redusert affinitet mellom analytt og stasjonærfase (se tabell 47 forsøk no. 12-32).
- Økt kolonnetemperatur fører til redusert affinitet mellom analytt og stasjonærfase og dermed redusert retensjonstid (se tabell 47 og tabell 51).

Ved optimalisering av kolonnetemperatur og mobilfasesammensetning ble det utviklet en tilsynelatende velfungerende HPLC-analysemetoder for tetrakain (se tabell 51 forsøk no. 78) og metodevalideringsarbeidet ble satt i gang.

Figur 21 viser et normalkromatogram for analyse av tetrakain ($R_t=7,8$ min).



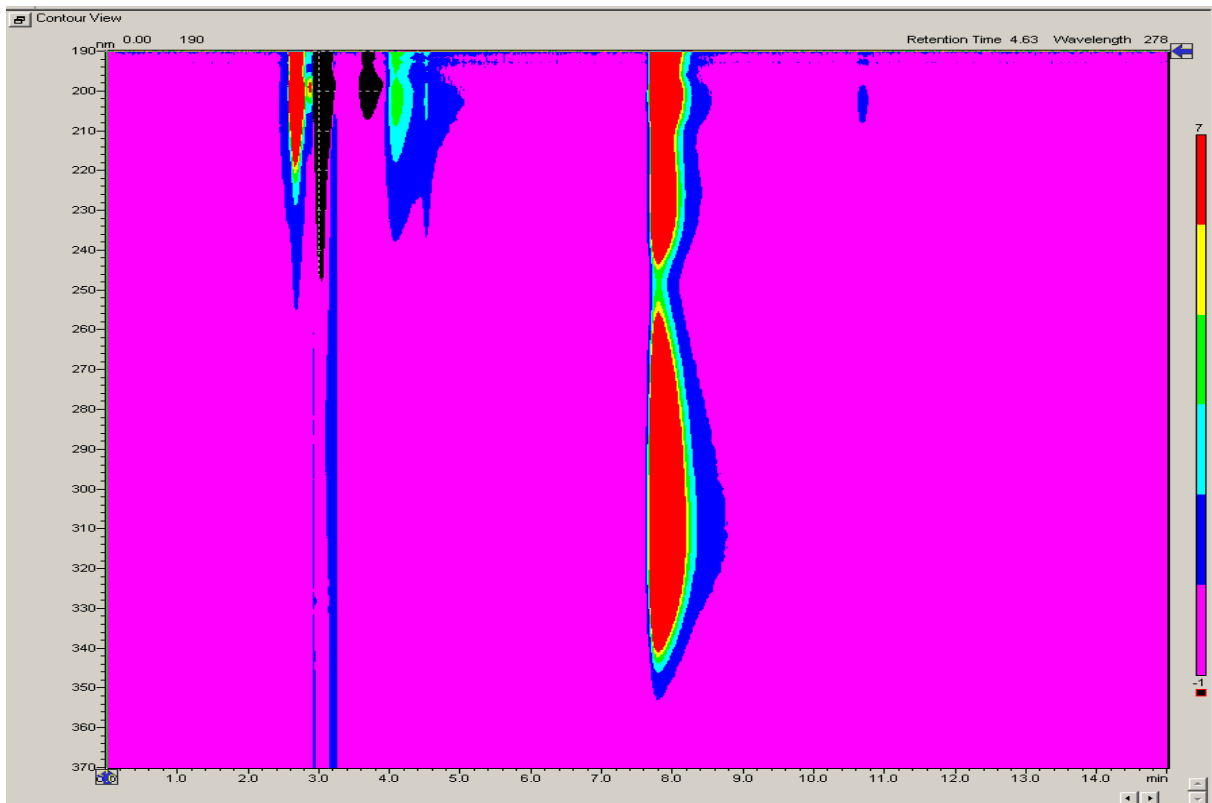
Figur 21: Kromatogram av et gammel tetrakain prøve spiket med adrenalin, tetrakain toppen observeres ved $R_t=7,8$ min. Prøven er analysert ved hjelp av tetrakainanalysemetode (tabell 51 forsøk no. 78)

4.1.4 Kvalitativ analyse, identifisering av tetrakain

For identifisering av tetrakain er det tatt opp et UV-spektrum (Figur 11, UV-spekter for tetrakain i vandig løsning). Figuren viser at tetrakain har maksimum UV-absorbans ved bølgelengder 200, 230, og 310 nm.

PDA-kromatogramet (contour plot) kan, som for adrenalin, benyttes til å identifisere tetrakain. Figur 22 viser tetrakaintoppen ved $R_t=7,8$ min hvor maksimum absorbans observeres ved 200, 230 og 310 nm. Tetrakain av høy renhet (98 %) fra anerkjent leverandør (Sigma) elueres med samme retensjonstid.

Toppen er ren og nærliggende toppe interfererer ikke. Figur 22 viser også adrenalin og hydrofile nedbrytningsprodukter som er eluert ved væskefronten (etter 2 minutter).



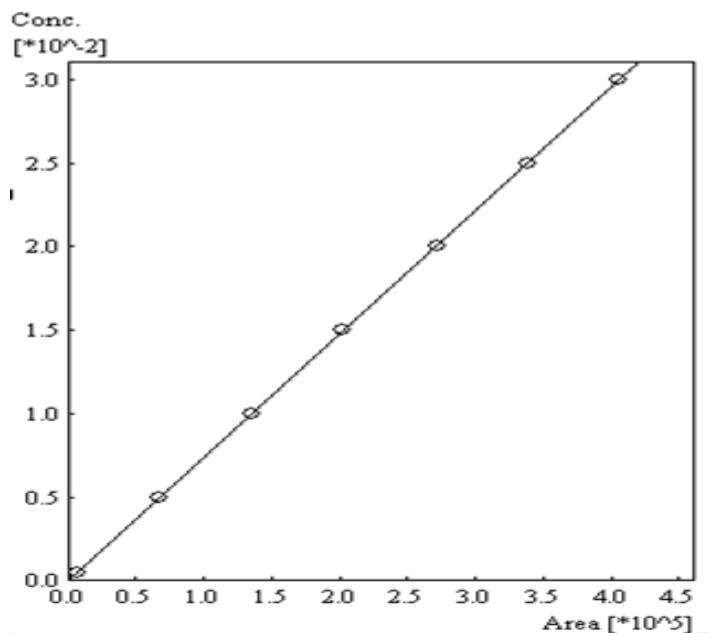
Figur 22: PDA-kromatogram (contour plot) av en gammel tetrakainprøve spiket med adrenalin. Tetrakaintoppen observeres ved $R_t=7,8$ min og med et maksimum UV-absorbans på 310 nm. Adrenalin og hydrofile nedbrytningsprodukter er eluert ved væskefronten (etter 2 minutter). Prøven er analysert ved hjelp av tetrakainanalysemetode (tabell 51 forsøk no. 78)

4.2 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR ADRENALIN

4.2.1 Linearitet

Lineariteten av en analytisk prosedyre er metodens evne til å oppnå testresultater som er direkte proporsjonale med konsentrasjon (mengde) av analytt i prøven i et gitt område (International Conference of Harmonization 2005). ICHs retningslinjer anbefaler at lineariteten for metode måles for minimum 80-120 % av normalkonsentrasjonen om et ferdig produkt skal analyseres. Minst fem konsentrasjoner bør benyttes (International Conference of Harmonization 2005).

Fordi nedbrytning av prøver skal undersøkes, velges 20 % av normal konsentrasjonen som laveste konsentrasjon. Høyest konsentrasjon settes til 150 % av normal mengde grunnet bruk av standard kurve fra 50-150 % (Clarke 1994). Analysen utføres ved 7 konsentrasjoner (n=3). Korrelasjonskoeffisienten (r) bør være $> 0,999$, med tilsvarende $r^2 > 0,998$. Relativt standard avvik (RSD) bør være $\leq 2,0$ % for hvert punkt (Shabir 2002). Sykehusapotekene HF har intern krav på $r^2 \geq 0,998$ og $RSD < 1$ % for hvert punkt (sykehusapotekenes prosedyre for validering av metoder for HPLC-analyse 2010). Kravene er oppfylt siden $r^2 = 0,999$ (Figur 23) og høyeste RSD for enkeltpunkt er 0,7 %. Metoden har tilfredsstillende linearitet i området 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$.



Figur 23: Regresjonslinje for adrenaline i området 0,5-30 $\mu\text{g/ml}$ (n= 3): $r^2=0,999$, høyeste RSD for enkeltpunkt = 0,7 %

4.2.2 Nøyaktighet

Nøyaktigheten til en analytisk prosedyre uttrykker samsvar mellom den verdien som er akseptert, enten som en konvensjonelle sann verdi eller en akseptert referanse verdi, og verdien funnet under analysen. Dersom linearitet, presisjon og spesifisitet er validert fastslår ICH at nøyaktighet er tilstrekkelig dokumentert (International Conference of Harmonization 2005).

Det er ikke utført noen egen validering av nøyaktighet for den aktuelle metoden.

Nøyaktigheten er dokumentert indirekte gjennom validering av linearitet, presisjon og spesifisitet. Dessuten er kvaliteten av standarden (adrenalin tartrat, Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, Renhet $\geq 98\%$) vurdert og funnet tilfredsstillende (avvik fra absolutt renhet på maksimalt 2 %).

4.2.3 Deteksjonsgrense (LOD)

Deteksjonsgrense er den laveste mengden av analytt i en prøve som kan oppdages, uten nødvendigvis å kunne kvantifiseres som en eksakt verdi. Normalt settes deteksjonsgrensen ved analyttkonsentrasjon der forholdet mellom signal (S) og støy (N) er 3:1 (Clarke 1994).

For å bestemme deteksjonsgrense brukes ekstrapoleringer av fortynninger gjort under linearitetstesting.

Signal- og støyutslag for den laveste konsentrasjonen som kunne detekteres (adrenalin 0,05 $\mu\text{g/ml}$) ble målt ved hjelp av linjal og var forholdsvis $S = 2,5$ cm og $N = 0,2$ cm og forholdet mellom dem er $S/N = 12,5$. Etter ekstrapolering, settes metodens deteksjonsgrense til 0,012 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Hensikt med validering av kvantifiseringsgrense er å bestemme laveste mengde analytt som kan kvantifiseres med tilfredsstillende presisjon og nøyaktighet. Normalt settes kvantifiseringsgrense ved analyttkonsentrasjon der forholdet mellom signal og støy er 10:1 (Clarke 1994).

For å bestemme kvantifiseringsgrens brukes ekstrapoleringer av fortynninger gjort under linearitetstesting.

Signal (S)- og støyutslag (N) for den laveste konsentrasjonen som kunne detekteres (adrenalin 0,05 $\mu\text{g/ml}$) ble målt ved hjelp av linjal og var forholdsvis $S = 2,5$ cm og $N = 0,2$ cm og forholdet mellom dem er $S/N = 12,5$. Etter ekstrapolering, settes metodens kvantifiseringsgrens til 0,04 $\mu\text{g/ml}$.

4.2.5 Bruksområde ("Range")

Hensikt med valideringen er å dokumentere at metoden er presis, og lineær i det aktuelle bruksområdet. Bruksområde (range) dokumenteres normalt i forbindelse med validering av linearitet og presisjon. Normalt undersøker apoteket lineariteten over et område på minst 50-150 % av aktuell målkonsentrasjon.

Det kreves linearitet på ($r^2 > 0,998$) og en presisjon ved øvre og nedre grense i bruksområdet på ± 2 % RSD (Brustugun 2010).

Presisjon ved 50 % og 150 % av normalkonsentrasjon er dokumentert ved at RSD for seks injeksjoner av hver konsentrasjon (brukt i standard kurve under linearitets testing) ble beregnet (Tabell 25). For konsentrasjoner på 50 % og 150 % av normalkonsentrasjon ble det beregnet relativ standardavvik på henholdsvis 0,20 % og 0,06 % og en regresjon på $r^2 > 0,999$. Metoden tilfredsstiller kravet på inntil 2 % RSD.

Tabell 25: Validering av bruksområdet for adrenalins analysemetodens

% av Normal konsentrasjon	Normal konsentrasjon mg/ml	Regresjon (r^2)	RSD (%) for seks injeksjoner av hver normal konsentrasjon
50	0,10	0,999	0,20
100	0,20		0,11
150	0,30		0,06

4.2.6 Systempresisjon

Systempresisjonen uttrykker instrumentenes presisjon over en rekke målinger av samme homogen prøve.

Det ble foretatt 6 injeksjoner fra et HPLC-injektorglass (Chandran 2007). Spredning av analyse svarene skyldes tilfeldige variasjoner som ligger i instrumentet.

Relativt standard avvik for de seks injeksjonene ble 0,18 % (Tabell 26). RSD bør være ≤ 1 % (Shabir 2002). Metoden har tilfredsstillende systempresisjon.

Tabell 26: Validering av systempresisjon for adrenalins analysemetodens

Adrenalinprøve (20 $\mu\text{g/ml}$)	Konsentrasjon ($\mu\text{g/ml}$)
Injeksjon 1	20
Injeksjon 2	20
Injeksjon 3	20
Injeksjon 4	20
Injeksjon 5	20
Injeksjon 6	19
Gjennomsnitt	20
SD	$3,588 \times 10^{-5}$
RSD (%)	0,18

4.2.7 Interdagvariasjon

Interdagvariasjon uttrykker spredningen av analyseresultatene utført i løpet av en lengre periode. Forskjell i analyseresultater skyldes tilfeldige forandringer som kan oppstå under analysen i laboratorium. ICH har ikke spesifisert et krav i sine anbefalinger.

Analyseresultater, oppnådd over seks dager, har et relativt standardavvik på 0,64 % (Tabell 27), den bør ha $RSD \leq 2\%$ (Shabir 2002).

Metoden har et tilfredsstillende interdagvariasjon.

Tabell 27: Interdagvariasjon for adrenalins analysemetodens

Analysedag	Adrenalin ($\mu\text{g/ml}$)
Dag 1	19,8
Dag 2	19,9
Dag 3	20,1
Dag 4	20,0
Dag 5	20,2
Dag 6	20,0
Gjennomsnitt	20,0
SD	0,0001
RSD (%)	0,6434

4.2.8 Intradagvariasjon

Intradaganalysen sier noe om metodens repeterbarhet i løpet av en dag, og foregår under identiske betingelser over en kort tidsperiode. Spredningen av analysesvarene skyldes tilfeldige variasjoner som kan oppstå under en analyse.

Intradagvariasjonen er dokumentert under validering av interdagvariasjon. Gjennomsnittlig RSD for hver av de seks analysedagene som inngikk i interdagvariasjonen er vist i Tabell 28. Gjennomsnittet for de seks dagene er på 0,4 % og høyeste verdi er 0,7 %. Metoden bør ha $RSD \leq 2\%$ (Shabir 2002), og dette er oppfylt her. Metoden har tilfredsstillende intradagvariasjon.

Tabell 28: Intradagvariasjon for adrenalins analysemetodens

Analyse dag	RSD (%)
Dag 1	0,39
Dag 2	0,26
Dag 3	0,34
Dag 4	0,42
Dag 5	0,70
Dag 6	0,33
Gjennomsnitt	0,40

4.2.9 Spesifisitet

Spesifisiteten angir metodens evne til å bestemme analytten nøyaktig i nærvær av andre substanser (for eksempel degraderingsprodukter og tilsetningsstoffer) som kan være tilstede i prøvens matriks.

Intern krav ved Sykehusapotekene HF tilsier at oppløsning (R_S) må være $\geq 1,0$ (Brustugun 2010).

Til dette formål ble det analysert både rene, oksiderte, varmebehandlede, og syredegraderte prøver av adrenalin, samt tilsvarende prøver som inneholdt både adrenalin og tetrakain. Det ble også gjort analyser av et gammelt tetrakain preparat (tetrakain 13,3 mg/ml, gammel preparat, utløpsdato 21.04.2007) som var tilsatt adrenalin (0,2 mg/ml). Det ble ikke observert eluerte topper som interfererte med adrenalins topp, eller som ble eluert i området der adrenalin var forventet og eluere. R_S -verdiene som er oppnådd for disse prøvene tilfredstiller minimumskrav $R_S \geq 1,0$ (Tabell 29).

Tabell 29: Spesifisitet for adrenalins analysemetodens (n = 3)

Prøve	Oppløsning (R_S) i forhold til nærmeste topp som eluerer tidligere enn adrenalin	Oppløsning (R_S) i forhold til nærmeste topp som eluerer senere enn adrenalin
Ren adrenalin	3,15	Ingen topp eluert senere
Adrenalin (varmebehandlet i 5 døgn)	1,74	28,95
Adrenalin+adrenokrom	1,62	1,22
Adrenalin+H ₂ O ₂	3,65	30,06
Adrenalin+tetrakain+ H ₂ O ₂	1,47	29,78
Adrenalin (syredegradert)	3,53	29,35
Adrenalin+tetrakain+Adrenokrom	1,20	4,23
Adrenalin+tetrakain (varmebehandlet i 1 døgn)	1,74	28,95
Adrenalin+gammel tetrakain	2,47	6,13

4.2.10 Robusthet

Robusthet viser metodens evne til ikke å påvirkes betydelig av mindre endringer i metodens kromatografiske betingelser. Retensjonstiden skal ikke endres så mye at andre topper interfererer med adrenalintoppen. Oppløsningen (R_S) bør være $\geq 1,0$ (Brustugun 2010).

Degraderte prøver av adrenalin brukt i validering av spesifisitet ble analysert under nye betingelser med hensyn på mobilfasesammensetning, mobilfasehastighet og kolonnetemperatur.

Valideringen (Tabell 30) viser at metoden i liten grad påvirkes av pH. Størst betydning har buffersaltkonsentrasjonen men det viser seg at små endringer i saltkonsentrasjonen ($\pm 0,001M$) ikke påvirker metodens separasjonsevne og dermed spesifisitet. Oppløsningen (R_S) er tilfredsstillende i alle prøver.

Validering viser ingen eluenter som interfererer med adrenalin.

Tabell 30: Validering av robusthet for adrenalins analysemetodens

Metodens betingelser				Resultater for (utvalgt prøve); Tetrakain 16mg/ml-adrenalin 0,2mg/ml, varmebehandlet ved 70 °C i fem døgn	
Flow (ml/min)	Buffer- pH	T °C	[KH ₂ PO ₄] M	R _t (min) retensjonstid for adrenalin	Oppløsning (R_S), adrenalin i forhold til nærmeste topp
1,3	3,5	15	0,015	3,50	7,03
1,3	3,7	15	0,015	3,52	2,33
1,2	3,6	15	0,015	3,79	4,25
1,4	3,6	15	0,015	3,26	6,85
1,3	3,6	16	0,015	3,50	7,06
1,3	3,6	14	0,015	3,53	2,08
1,3	3,6	15	0,016	3,52	6,91
1,3	3,6	15	0,014	3,50	6,84
1,3	3,6	15	0,015	3,51	3,81

4.2.11 Prøvestabilitet

Prøvestabilitet undersøkes for å se om prøvene er tilstrekkelig stabile til at analyser kan strekke seg over relevant tidsrom. Prøvens konsentrasjon skal ikke endre seg mer enn 2 % i løpet av 24 timer ved 4 °C (Shabir 2002).

Kravet er oppfylt også etter 144 timer for adrenalin (Tabell 31).

HPLC-prøver av produktet er stabile med hensyn på adrenalin i 144 timer ved 4 °C.

Tabell 31: Prøvestabilitet adrenalin

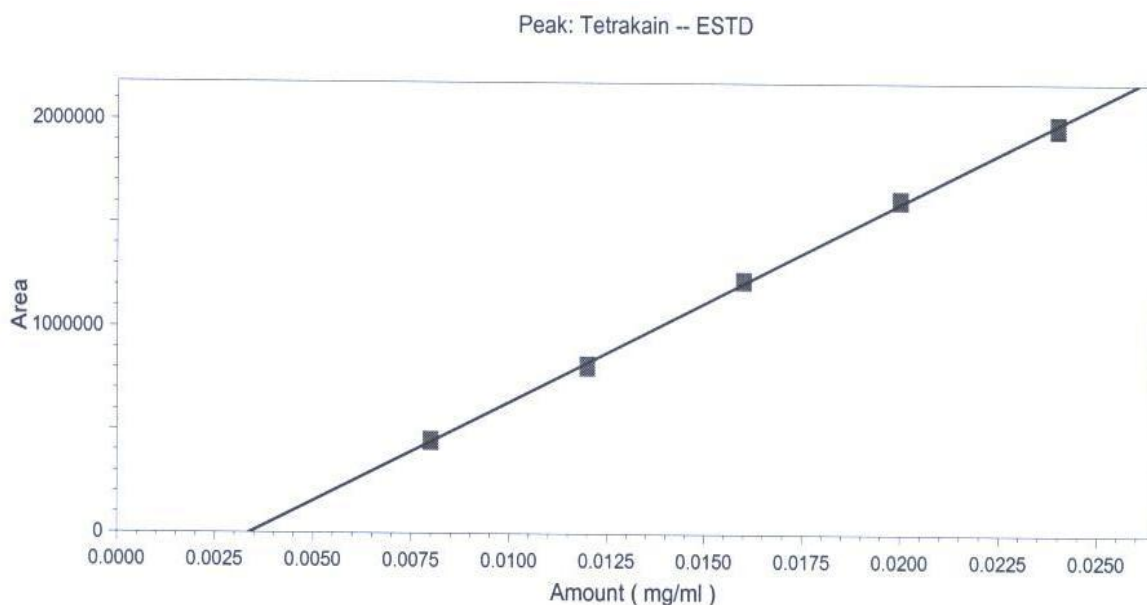
Prøve Adrenalin 20 µg/ml	Adrenalin µg/ml		% Igjen etter 144 timer
	Tid 0 t	Tid 144 t	
1	19,95	20,29	101,71
2	19,92	20,18	101,30
3	20,03	20,36	101,62
Gjennomsnitt	19,89	20,12	101,34
SD	$7,73 \times 10^{-5}$	$1,82 \times 10^{-4}$	0,43
RSD (%)	0,39	0,90	0,42

4.3 VALIDERING AV HPLC-ANALYSEMETODE FOR TETRAKAIN

4.3.1 Linearitet

Korrelasjonskoeffisienten (r) bør være $> 0,999$, med tilsvarende $r^2 > 0,998$. Relativt standard avvik (RSD) bør være $\leq 2,0\%$ for hvert punkt (Shabir 2002). Sykehus apotekene HF har internkrav på $r^2 \geq 0,998$ og $RSD < 1\%$ (Brustugun 2010). Kravene er oppfylt siden $r^2 = 0,999$ (Figur 24) og $RSD = 0,66\%$.

Metoden har tilfredsstillende linearitet i området 8-24 $\mu\text{g/ml}$.



Figur 24: Regresjonslinje for adrenalin i området 4-32 $\mu\text{g/ml}$ ($n=3$): $r^2=0,999$, høyeste RSD for enkeltpunkt = 0,66 %

4.3.2 Nøyaktighet

Nøyaktigheten til en analytisk prosedyre uttrykker samsvar mellom den verdien som er akseptert, enten som en konvensjonelle sann verdi eller en akseptert referanse verdi, og verdien funnet under analysen. Dersom linearitet, presisjon og spesifisitet er validert fastslår ICH at nøyaktighet er tilstrekkelig dokumentert (International Conference of Harmonization 2005). Det er ikke utført noen egen validering av nøyaktighet for den aktuelle metoden.

Nøyaktigheten er dokumentert indirekte gjennom validering av linearitet, presisjon og spesifisitet. Dessuten er kvaliteten av standarden (tetrakainhydroklorid Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland, Renhet $\geq 99\%$) vurdert og funnet tilfredsstillende (avvik fra absolutt renhet på maksimalt 2 %).

4.3.3 Deteksjonsgrense (LOD)

Normalt settes deteksjonsgrensen ved analyttkonsentrasjon der forholdet mellom signal (S) og støy (N) er 3:1 (Clarke 1994). For å bestemme deteksjonsgrense brukes ekstrapoleringer av fortyntinger gjort under linearitetstesting.

Signal- (S) og støyutslag (N) for den laveste konsentrasjonen som kunne detekteres (Tetrakain 0,004 µg/ml) ble målt ved hjelp av linjal og var henholdsvis S = 5 mm og N = 1,5 mm og forholdet mellom dem er S/N = 3,3.

Metodens deteksjonsgrense settes på bakgrunn av dette til 0,004 µg/ml.

4.3.4 Kvantifiseringsgrense (LOQ)

Normalt settes kvantifiseringsgrense ved analyttkonsentrasjon der forholdet mellom signal og støy er 10:1 (Clarke 1994).

For å bestemme kvantifiseringsgrens brukes ekstrapoleringer av fortyntinger gjort under linearitetstesting.

Signal- (S) og støyutslag (N) for den laveste konsentrasjonen som kunne detekteres (Tetrakain 0,004 µg/ml) ble målt ved hjelp av linjal og var henholdsvis S = 5 mm og N = 1,5 mm og forholdet mellom dem er S/N = 3,3.

Metodens deteksjonsgrense settes på bakgrunn av dette til 0,012 µg/ml.

4.3.5 Bruksområde ("Range")

Bruksområde (range) dokumenteres normalt i forbindelse med validering av linearitet og presisjon.

Normalt undersøker apoteket lineariteten over et område på minst 50-150 % av aktuell målkonsentrasjon. Presisjon ved 50 % og 150 % ble dokumentert under validering av interdag-presisjon der ble det brukt en trepunkts standardkurve (normalt 50-150 % av målkonsentrasjon). Til denne standardkurven er det knyttet krav til linearitet ($r^2 > 0,998$) og presisjon for hvert punkt (maksimalt avvik for hvert punkt er ± 2 %). Så lenge kravene til standardkurven under disse forsøkene er innfridd og metoden tilfredsstillende valideringen av linearitet ($r^2 > 0,998$) betraktes dette som en tilstrekkelig dokumentasjon av egnet bruksområde (Brustugun 2010).

Maksimal RSD ved 50 % av normalkonsentrasjon ble funnet å være 1,13 %. Maksimal RSD ved 150 % av normalkonsentrasjon var 1,40 %. Minste r^2 var 0,998.

Metoden tilfredsstillende kravet på RSD ± 2 % og $r^2 > 0,998$. Resultatene er oppsummert i Tabell 32.

Tabell 32: Bruksområde ("Range") for tetrakains analysemetode

Dag	RSD for 50 % av normal konsentrasjon (8 mg/ml)	RSD for 150 % av normal konsentrasjon (24 mg/ml)	r^2
1	1,13	0,05	0,999
2	0,09	0,03	0,999
3	0,07	0,07	0,998
4	0,01	0,02	0,999
5	0,03	1,40	0,999
6	0,02	0,03	0,999
Gjennomsnitt	0,23	0,48	0,999

4.3.6 Systempresisjon

Relativt standardavvik for de seks injeksjonene ble funnet å være 0,13 % (Tabell 33). RSD bør være ≤ 1 % (Shabir 2002). Metoden har tilfredsstillende systempresisjon.

Tabell 33: Systempresisjon for tetrakains analysemetode

Tetrakain prøve (16 µg/ml)	Konsentrasjon (µg/ml)
Injeksjon 1	16,0
Injeksjon 2	16,0
Injeksjon 3	16,1
Injeksjon 4	16,1
Injeksjon 5	16,0
Injeksjon 6	16,1
Gjennomsnitt	16,0
SD	$2,06 \times 10^{-5}$
RSD (%)	0,13

4.3.7 Interdagvariasjon

Analyser av en tetrakain-adrenalinblanding foretatt av på seks ulike dager, hadde et relativt standardavvik for tetrakain på 1,84 % (Tabell 34). Avviket bør være ≤ 2 % (Shabir 2002). Metoden har et tilfredsstillende interdagvariasjon.

Tabell 34: Interdagvariasjon for tetrakains analysemetode

Dag	Tetrakain (mg/ml)
1	16,02
2	15,70
3	15,96
4	16,40
5	15,56
6	16,08
Gjennomsnitt	15,96
SD	0,29
RSD (%)	1,84

4.3.8 Intradagvariasjon

Gjennomsnitt RSD for seks analyse dager (utført under interdagvariasjonen) er på 1,06 % (Tabell 35). Det relativ standardavviket bør være ≤ 2 % hver enkelt dag (Shabir 2002), og dette er oppfylt her.

Metoden har tilfredsstillende intradagvariasjon.

Tabell 35: Intradagvariasjon for tetrakains analysemetode

Analyседag	RSD (%)
1	0,78
2	1,17
3	0,86
4	1,36
5	1,26
6	0,95
Gjennomsnitt	1,06

4.3.9 Spesifisitet

Eventuelle degraderingsprodukter og tilsetningsstoffer bør være grunnlinje-separert fra tetrakain med en oppløsning (R_S) $\geq 1,5$ (Shabir 2002). Intern krav ved Sykehusapotekene HF tilsier at oppløsning (R_S) bør være $\geq 1,0$ (Brustugun 2010).

Til dette formål ble det analysert både rene, oksiderte (både ved å tilsette oksidasjonsfremmende agens H_2O_2 og AAPH (2,2'-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride)), varmebehandlede, og syredegraderte prøver av tetrakain, samt tilsvarende prøver som inneholdt både adrenalin og tetrakain. Det ble også gjort analyser av et gammelt tetrakain preparat (tetrakain 13,3 mg/ml, gammel preparat, utløpsdato 21.04.2007) som var tilsatt adrenalin (0,2 mg/ml). Det ble ikke observert topper som interfererte med tetrakain topp, eller som ble eluert i området der tetrakain var forventet og eluere. R_S -verdiene som er oppnådd for disse prøvene tilfredsstiller minimumskrav $R_S \geq 1,0$ (Tabell 36).

Tabell 36: Spesifisitet for tetrakains analysemetode

Prøver	Oppløsning (R_S) i forhold til nærmeste topp som eluerer tidligere enn tetrakain:	Oppløsning (R_S) i forhold til nærmeste topp som eluerer senere enn tetrakain:
Ren tetrakain	16	Ingen topp
Tetrakain+ H_2O_2	5	Ingen topp
Tetrakain+adrenalin+ H_2O_2	5	Ingen topp
Tetrakain+AAPH	19	Ingen topp
Tetrakain (syredegradert)	19	Ingen topp
Tetrakain+adrenalin + 4-(butyl amino) benzoic acid	18	Ingen topp
Tetrakain+ adrenalin (varmebehandlet prøve)	16	Ingen topp

4.3.10 Robusthet

Retensjonstiden skal ikke endres så mye at andre topper interfererer med tetrakaintoppen. Oppløsningen (R_s) bør være $\geq 1,0$ (Brustugun 2010). Degraderte prøver av tetrakain brukt i validering av spesifisitet ble analysert under varierende betingelser med hensyn på mobilfasesammensetning og buffer-pH.

Valideringen viser at metoden i liten grad påvirkes av buffer-pH. Størst betydning har organiskfasekonsentrasjonen (Tabell 37) men det viser seg at små endringer i organiskfasekonsentrasjon og pH, ikke påvirker metodens separasjonsevne og dermed spesifisitet. Oppløsningen er tilfredsstillende i alle prøver.

Tabell 37: Robusthet for tetrakains analysemetode

Metodens betingelser				Resultater for (utvalgt prøve); Tetrakain 16 mg/ml – adrenalin 0,2mg/ml, varmebehandlet ved 70 °C i fem døgn	
Flow (ml/min)	Buffer pH	Temperatur °C	% Metanol	R_t (min) retensjonstid tetrakain	Oppløsning (R_s) i forhold til nærmeste topp
1	7,2	45	70	7,8	13
1	6,6	45	70	8,4	13
1	6,9	45	72	7,1	12
1	6,9	45	68	9,4	16
1	6,9	45	70	8,1	14

4.3.11 Prøvestabilitet

Prøvenes stabilitet ble undersøkt over 120 timer ved 4 °C (Tabell 38). Prøvens konsentrasjon skal ikke endre seg mer enn 2 % i løpet av 24 timer ved 4 °C (Shabir 2002). Den observerte verdien på 100,35 % etter oppbevaringstiden peker mot at det ikke er noen endring i konsentrasjonen av tetrakain over det aktuelle tidsrommet. Den tilsynelatende økningen på 0,35 % ligger innenfor metodens usikkerhet (metoden har for eksempel en interdagpresisjon på 1,84 %).

Ferdig fortynnede prøver av tetrakain er stabile i 120 timer ved 4 °C.

Tabell 38: Prøvestabilitet tetrakain

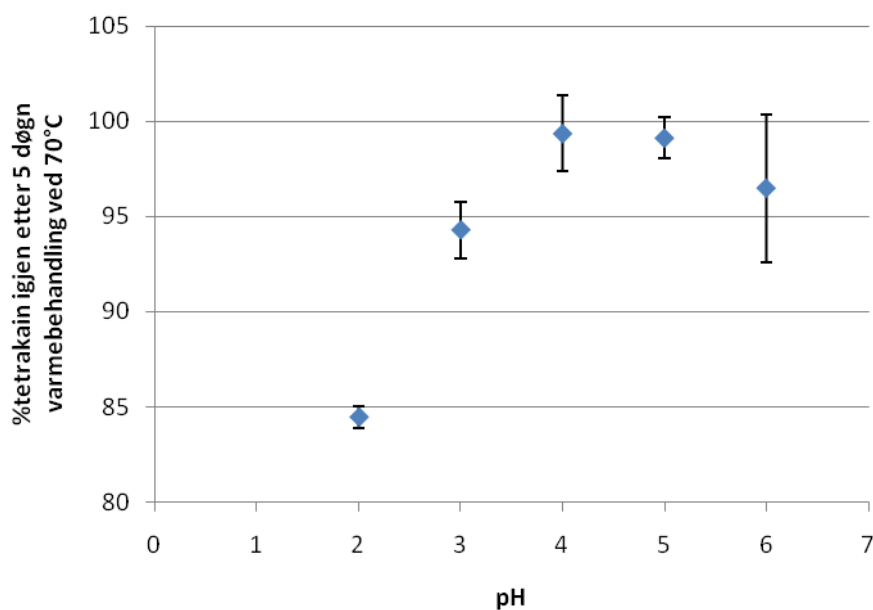
Prøve	Tetrakain mg/ml etter;		% Igjen etter 120 timer
	Tid 0 t	Tid 120 t	
1	15,69	15,68	99,93
2	15,86	16,09	101,50
3	15,80	15,75	99,62
Gjennomsnitt	15,79	15,84	100,35
SD	0,09	0,18	1,01
RSD	0,55	1,16	1,01

4.4 PREFORMULERINGSSTUDIER FOR TETRAKAIN OG TETRAKAIN-ADRENALIN

4.4.1 pH-stabilitetskurve for tetrakain

Tetrakain har en pKa- verdi på 8,39 og er en svak base. En 1 % tetrakainhydrokloridløsning i vann har en pH på 4,5 til 6,5. I pH områder over $\approx 6,5$ vil tetrakain felle ut (se beregning av pH_p, utfellings pH, tabell 53). Ved lav pH vil syrekatalysert nedbrytning av esterbindingen (Figur 10) og oksidasjon av den tertiære amingruppen øke (Figur 9). Løsningers pH påvirker normalt både stabilitet og løseligheten til stoffer. For tetrakain har det imidlertid ikke latt seg gjøre å oppdrive en pH-stabilitetskurve. Stabiliteten til tetrakain ved 70 °C ble derfor undersøkt ved ulike pH-verdier. Resultatene er sammenfattet i Figur 25.

Forsøket viser at tetrakainhydroklorid har høyest stabilitet ved pH mellom 4,0 – 5,0.



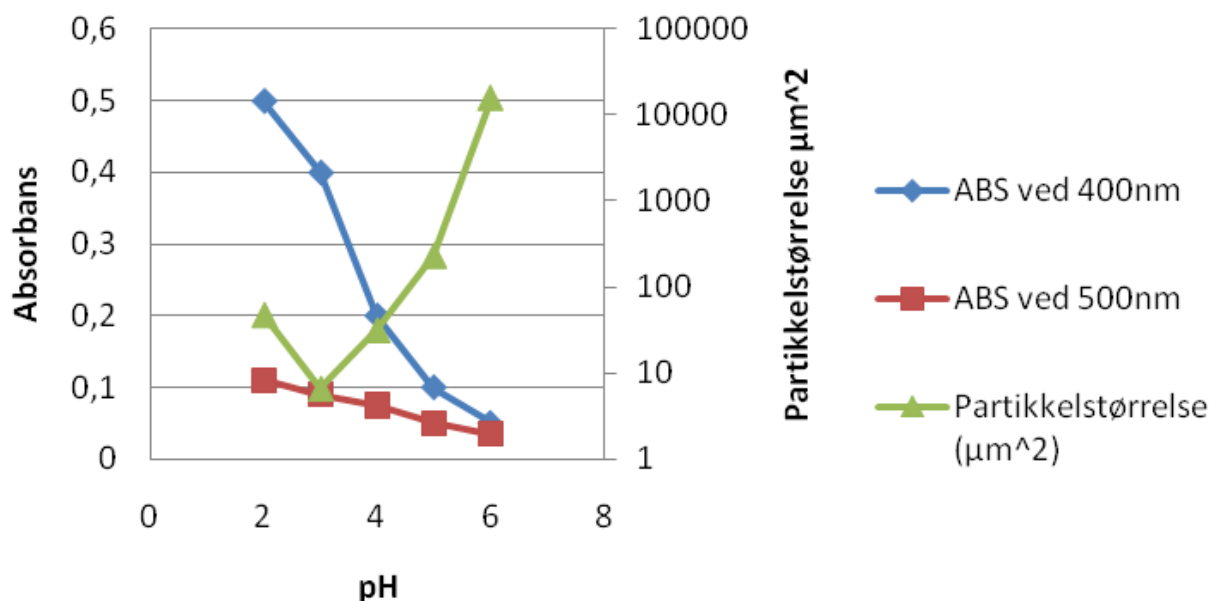
Figur 25: pH-stabilitetskurve for tetrakain (n=3)

4.4.2 Undersøkelse av misfarging ved absorbansmåling, visuell kontroll og mikroskopering

Misfarging av tetrakain- og adrenalinløsninger – hver for seg og i kombinasjon – er et kjent problem. Det var derfor interessant å undersøke hvilke pH-verdier som ga minst misfarging. Som mål på misfarging ble det brukt ulike parametre: absorbans ved to bølgelengder (400 og 500 nm) i det synlige området, partikkelstørrelse (observert ved mikroskopering), samt visuell kontroll med subjektiv beskrivelse av utseende.

Av Figur 26 og Tabell 39 går det frem at det er mest misfarging ved lav pH – det er også ved lav pH at nedbrytningen av tetrakain er størst (misfarging indikerer nedbrytning).

Misfargingen avtar selv om nedbrytningen av tetrakain tilsynelatende øker igjen ved den høyest undersøkte pH-verdien, pH 6. Ved høyere pH (> 6) ser man imidlertid mer utfellinger. Når misfargingen – i form av absorbans ved 400 og 500 nm – avtar ved høy pH kan dette skyldes at nedbrytningsprodukter feller ut og at den gjenværende væsken blir relativt klar. Misfarging av adrenalinløsninger skyldes adrenokrom, et nedbrytningsprodukt fra oksidasjon av stoffet. Tetrakainløsning misfarges ved nedbrytning, mest sannsynlig på grunn av polymerisering av nedbrytningsprodukter fra oksidasjon. Det er betydelig misfarging selv når løsningene er svært lite nedbrutt (< 1 %). Det viktigste nedbrytningsproduktet av tetrakain er para-amino benzosyre (PABA) som ikke har toksisitet i lave konsentrasjoner, doser opp til 400 mg per dag anses som trygg (Balch JF 1990). Dette peker mot at misfarging til en viss grad er et kosmetisk problem. Ved pH 4 har tetrakainløsningen optimal stabilitet.



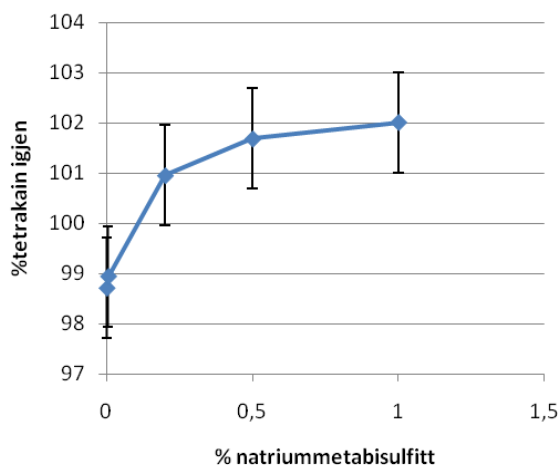
Figur 26: Absorbans ved 400 nm og 500nm, som indikasjon på misfarging av tetrakain prøver (n=3) etter varmebehandling og grad av utfelling i form av polymerisering og dannelse av uløselige partikler (partikkelstørrelse)

Tbell 39: Fargeintensitet av tetrakain prøver etter varmebehandling (n=3), i form av absorbans og visuell beskrivelse av prøvens utseende

Prøver (pH)	ABS ved 500nm	ABS ved 400nm	Tetrakain igjen(%)	Observert utseende	Gjennomsnitt Partikkelstørrelse μm^2
Fersk tetrakain prøve (ikke varmebehandlet)	0	0	100	Fargeløs, ingen synlig utfelling	17,42
varmebehandlet tetrakain prøve (pH 2)	0,11	0,50	84,44	Misfarget gull -brun, ingen synlig utfelling eller flekker	47,13
varmebehandlet tetrakain prøve (pH 3)	0,09	0,40	94,30	Misfarget gull-brun, ingen synlig utfelling eller flekker	6,53
varmebehandlet tetrakain prøve (pH 4)	0,08	0,20	99,36	Misfarget gull-brun, utfellinger i form av små svart-brune flekker, satt på innsiden av beholder	31,33
varmebehandlet tetrakain prøve (pH 5)	0,05	0,10	99,12	Misfarget brun, utfellinger i form av mange små svart-brune flekker, og suspenderte partikler	230,20
varmebehandlet tetrakain prøve (pH 6)	0,03	0,05	96,50	Misfarget brun, utfellinger i form av mange små svart-brune filamenter, og suspenderte partikler	15833,33

4.4.3 Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakainstabilitet - innledende forsøk

Effekten av natrium metabisulfitt på tetrakains stabilitet ble undersøkt (for å studere dets antioksidant effekt på tetrakain) ved at tetrakainløsninger (16 mg/ml) med ulikt innhold av natriummetabisulfitt (0,005 %, 0,2 %, 0,5 % og 1 % (w/v)) ble autoklavert 10 ganger (16 min, 121 °C) og deretter varmebehandlet ved 70 °C i 5 døgn (n=3). Resultatet viser at forsøket ikke kan påvise verken en stabiliserende eller destabiliserende effekt av natriummetabisulfitt (Figur 27). Dette fordi analysemetoden har en usikkerhet på 1,8 % og variasjoner i tetrakainkonsentrasjonen, etter varmebehandling, ligger innenfor dette området (Figur 27). Forsøket viser imidlertid at tetrakain har stor varmestabilitet, og at stabilisering ved hjelp av antioksidanter er ikke nødvendig.

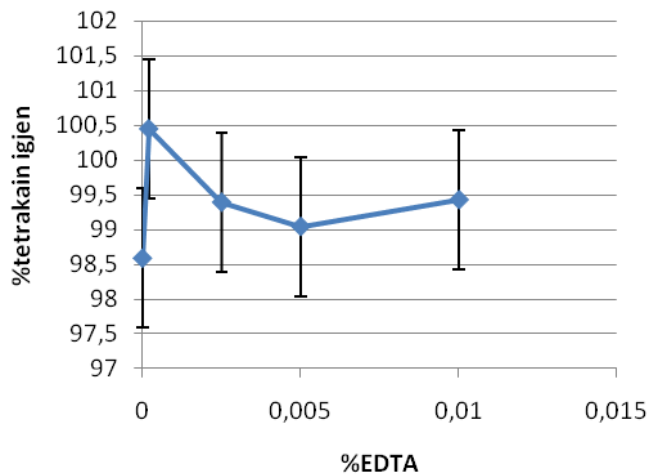


Figur 27: Effekt av natriummetabisulfitt på tetrakains stabilitet (prøver etter varmebehandling) (n=3)

4.4.4 Effekt av EDTA på tetrakain stabilitet - innledende forsøk

Effekten av dinatriumedetat på tetrakains stabilitet ble undersøkt (for å studere dets indirekte antioksidant effekt) ved at tetrakainløsninger (16 mg/ml) med ulikt innhold av dinatriumedetat (0,0002 %, 0,0025 %, 0,005 % og 0,01 % (w/v)) ble varmebehandlet ved 70 °C i 5 døgn (n=3). Som for løsningene med varierende innhold av bisulfitt var variasjonen i konsentrasjon for løsninger med ulikt innhold av EDTA liten (Figur 28). Resultatene for alle de fem løsningene ligger innenfor $\pm 1,8$ % som er metodens presisjon. Resultatet viser at forsøket ikke kan påvise verken en stabiliserende eller destabiliserende effekt av EDTA (Figur 28).

Derimot viser forsøket igjen at tetrakain har en stor varmemestabilitet.



Figur 28: Effekt av EDTA på tetrakains stabilitet (prøver etter varmebehandling) (n=3)

4.4.5 Effekter av natriummetabisulfitt, EDTA og adrenalin på stabiliteten av tetrakain

De innledende forsøkene for å kartlegge effekten av natriummetabisulfitt og EDTA hadde gitt begrensede resultater fordi tetrakain ikke var tilstrekkelig nedbrutt. På bakgrunn av dette ble det laget nye tetrakainløsninger (prøver 1-12 representert i Tabell 40-43, se Tabell 20 for full oversikt over innholdsstoffer). Disse inneholdt i tillegg til tetrakain: natriummetabisulfitt (0,005 %, 0,05 % og 0,1 % (w/v)) og dinatriumedetat (0,0002 %, 0,005 % og 0,01 % (w/v)). Halvparten av løsningene inneholdt adrenalin (0,2 mg/ml) og alle løsningene var justert til pH 4,0 (fordi både adrenalin og tetrakain har best stabilitet ved pH 4, se punkt 4.4.2).

Løsningene ble overført til 20 ml hetteglass og en sett med prøver (n=3) autoklavert (16 min, 121 °C). Deretter ble resten av hetteglassene varmebehandlet ved 70 °C i 30 døgn.

Konsentrasjonen av tetrakain ble bestemt for nylagede løsninger, etter autoklivering, og deretter etter 10, 20 og 30 døgns oppbevaring ved forhøyet temperatur.

Tabell 40-43 viser resultater for løsningene etter autoklivering (121 °C, 16min), samt etter 10, 20 og 30 døgns oppbevaring ved 70 °C.

Tabell 40: Prøver av tetrakain og tetrakain-adrenalin både med og uten EDTA og natriummetabisulfitt etter autoklivering (121 °C, 16min) (n=3)

Prøve	NMBS%	EDTA%	[Tet] Dag 0	[Tet] Ett.a.	%Tet igjen	[Adr] Dag 0	[Adr] Ett.a.	%Adr igjen	ABS 400 nm	ABS 500 nm
1	0,005	0	16,26	16,61	102,20	0	0	0	0,010	0,005
2	0,1	0	15,46	16,69	107,98	0	0	0	0,020	0,015
3	0	0,0002	16,16	16,66	103,13	0	0	0	0,010	0,005
4	0	0,01	16,29	16,57	101,72	0	0	0	0,010	0,005
5	0,05	0,005	15,72	16,04	102,06	0	0	0	0,010	0,005
6	0	0	15,65	16,23	103,73	0	0	0	0,030	0,020
7	0,005	0	16,12	16,30	101,20	0,20	0,19	95,0	0,020	0,010
8	0,1	0	16,52	16,40	99,05	0,20	0,19	95,0	0,010	0,005
9	0	0,0002	16,18	16,65	102,90	0,20	0,19	95,0	0,010	0,005
10	0	0,01	16,37	16,74	102,26	0,20	0,19	95,0	0,010	0,005
11	0,05	0,005	16,62	16,67	100,30	0,20	0,19	95,0	0,005	0,002
12	0	0	16,69	16,34	97,92	0,20	0,18	93,3	0,160	0,090
NMBS= Natriummetabisulfitt			ABS = Absorbans							
Tet = Tetrakain			Ett.a. = Etter autoklivering							
Adr = Adrenalin										

Tabell 43: Prøver av tetrakain og tetrakain-adrenalin både med og uten EDTA og natriummetabisulfitt etter 30 dager varmebehandling ved 70 °C (n=3)

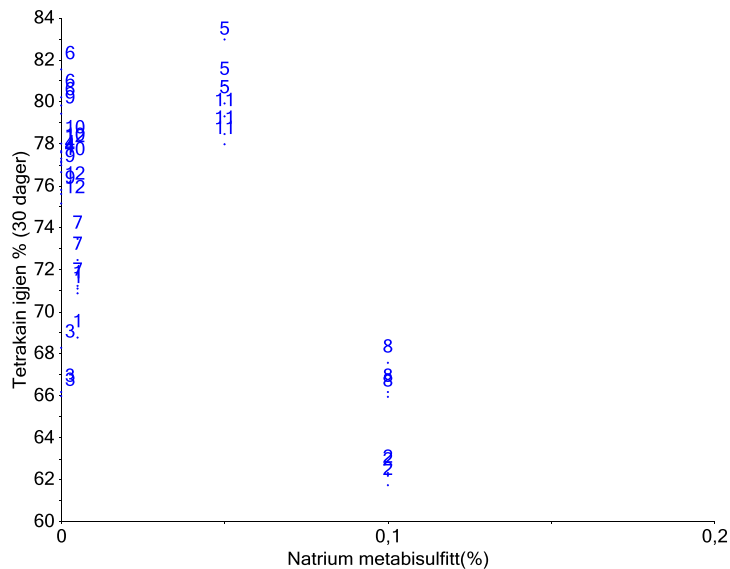
Prøve	NMBS%	EDTA%	[Tet] Dag0	[Tet] Dag30	%Tet igjen	[Adr] Dag0	[Adr] Dag30	%Adr igjen	ABS 400 nm	ABS 500 nm	pH Dag0	pH Dag30
1	0,005	0	16,26	11,42	84,29	0	0	0	1,90	1,00	4	4,02
2	0,1	0	15,46	9,60	74,73	0	0	0	1,90	0,40	4	3,30
3	0	0,0002	16,16	10,80	81,15	0	0	0	1,25	0,75	4	4,12
4	0	0,01	16,29	12,60	89,69	0	0	0	0,75	0,25	4	4,25
5	0,05	0,005	15,72	12,80	90,95	0	0	0	0,75	0,30	4	3,56
6	0	0	15,65	12,60	92,90	0	0	0	0,80	0,35	4	4,08
7	0,005	0	16,12	11,70	82,60	0,2	0	0	2,10	0,75	4	3,84
8	0,1	0	16,52	10,99	74,79	0,2	0	0	2,40	0,80	4	3,19
9	0	0,0002	16,18	12,50	83,25	0,2	0	0	1,60	0,70	4	3,80
10	0	0,01	16,37	12,70	85,40	0,2	0,0044	2,22	1,80	0,70	4	3,72
11	0,05	0,005	16,62	13,06	85,54	0,2	0,0038	4,92	2,20	1,00	4	3,42
12	0	0	16,69	12,71	82,40	0,2	0	0	3,50	3,20	4	3,67
NMBS= Natriummetabisulfitt			ABS = Absorbans									
Tet = Tetrakain												
Adr = Adrenalin												

Tabell 42-43 viser at lagring ved 70 °C over flere uker har gitt en nedbrytning som gjør at det er mulig å se på effekten av tilsetningsstoffer på stabiliteten av tetrakain. Etter 20 døgn er ca 16 % tetrakain brutt ned (Tabell 42) mens etter 30 døgn er ca 26 % nedbrutt (Tabell 43). Det virker rimelig å bruke tallene etter 30 dagers lagring (Tabell 43) når den stabiliserende effekten av tilsetningsstoffer på tetrakain skal vurderes.

Det er også interessant å se på stabiliteten av adrenalin. Datamaterialet er imidlertid mindre egnet til dette siden adrenalin enten er lite nedbrutt (Tabell 40, rett etter autoklaving) eller mye nedbrutt (Tabell 41, etter 10 dagers oppbevaring ved forhøyet temperatur). Til tross for dette vil en analyse av adrenalins stabilitet bli foretatt på grunnlag av resultatene etter ti dager (Tabell 41).

a) Stabilitet av tetrakain

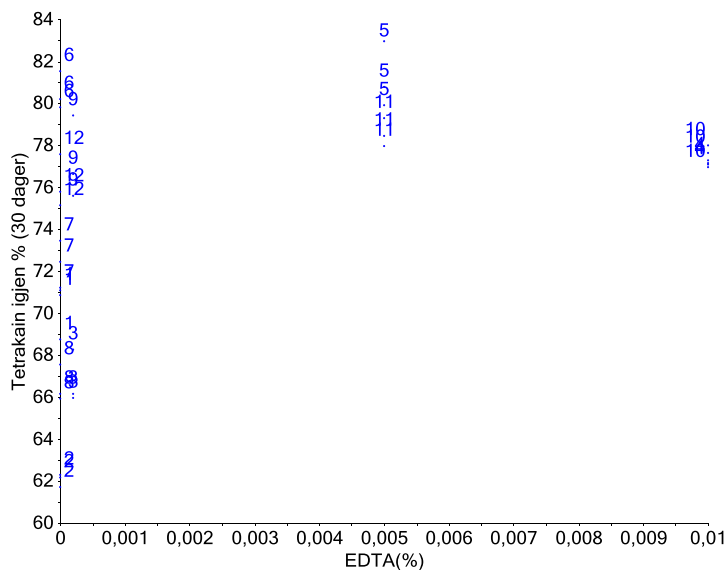
Figur 29 viser et plott av bisulfittkonsentrasjon mot konsentrasjon av tetrakain (% igjen) etter 30 døgn (prøver 1-12 representert i Tabell 43).



Figur 29: Gjenstående tetrakainmengde etter 30 dagers oppbevaring ved 70 °C som funksjon av bisulfittkonsentrasjon (prøver 1-12 representert i Tabell 43).

Figur 29 indikerer at stabiliteten av tetrakain er best ved en konsentrasjon av bisulfitt på 0,05 %. Dårligere stabilitet sees både ved lavere og høyere konsentrasjon av tilsetningsstoffet.

Figur 30 viser et plott av EDTA-konsentrasjon mot konsentrasjon av tetrakain (% igjen) etter 30 døgn (prøver 1-12 representert i Tabell 43).

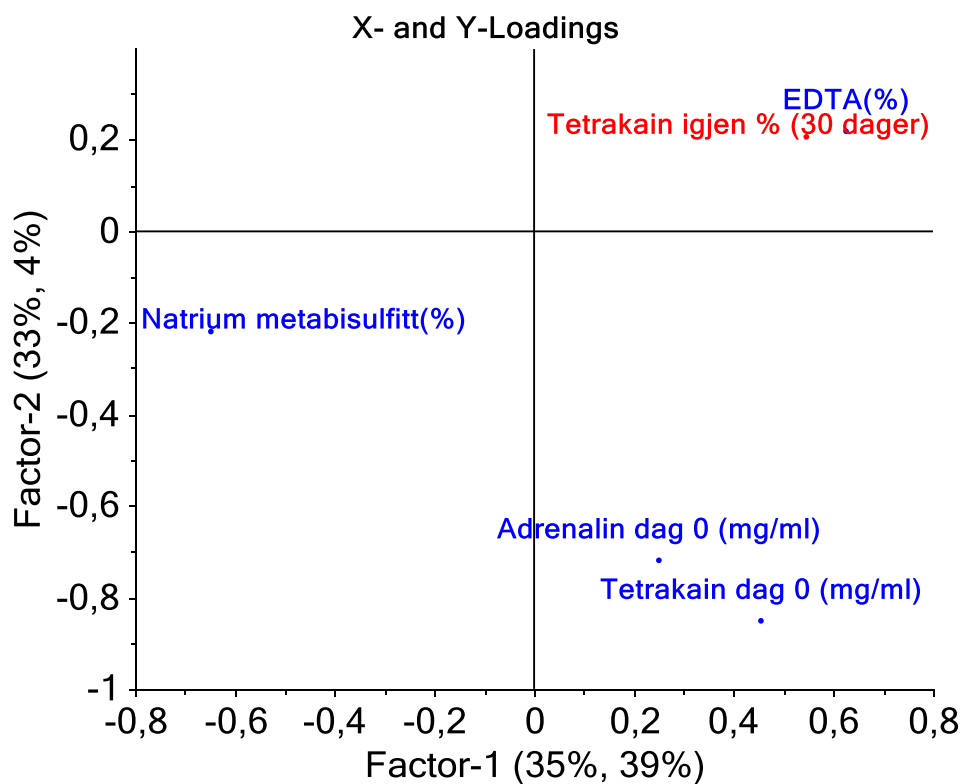


Figur 30: Gjenstående tetrakainmengde etter 30 dagers oppbevaring ved 70 °C som funksjon av EDTA-konsentrasjon (prøver 1-12 representert i Tabell 43).

Figur 30 viser at stabiliteten av tetrakain kan være svak når løsningene er uten EDTA eller inneholder lite EDTA (0,0002 %). Stabiliteten er bedre – og jevn – når løsningene inneholder 0,005 % EDTA eller mer.

For å få et helhetsbilde av stabiliteten til tetrakain og ulike variables innvirkning på stabiliteten ble det foretatt en PLS analyse for resultater etter 30 døgns lagring (prøver 1-12 representert i tabell 43). Alle PLS-analysene er foretatt med full kryssvalidering og alle data ble vektet ved å dividere på standardavvik. Analysen benyttet NIPALS algoritmen.

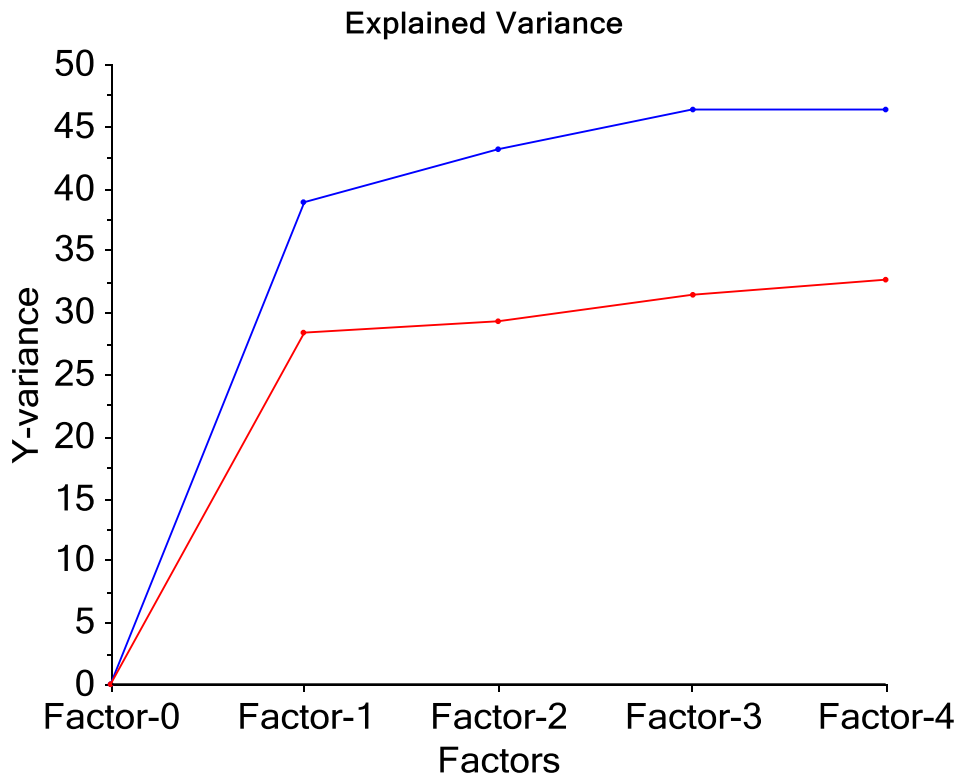
Figur 31 viser et PLS plot der variablene er EDTA (%), natriummetabisulfitt (%), samt utgangskonsentrasjon av tetrakain og adrenalin (prøver 1-12 representert i tabell 43).



Figur 31: PLS-plott for ulike variablers innvirkning på tetrakainstabilitet (prøver 1-12 representert i tabell 43).

Variabelen "Natriummetabisulfitt (%)" ligger på motsatt side av origo for responsen "Tetrakain igjen % (30 dager)". Variabelen og responsen er derfor negativt korrelert og plottet tilsier at bisulfitt har en destabiliserende effekt på tetrakain. På samme måte fremgår det at EDTA har en stabiliserende effekt på tetrakain. Utgangskonsentrasjonene av adrenalin og tetrakain har lite positiv eller negativ korrelasjon med gjenværende mengde tetrakain og har sannsynligvis liten betydning for stabiliteten.

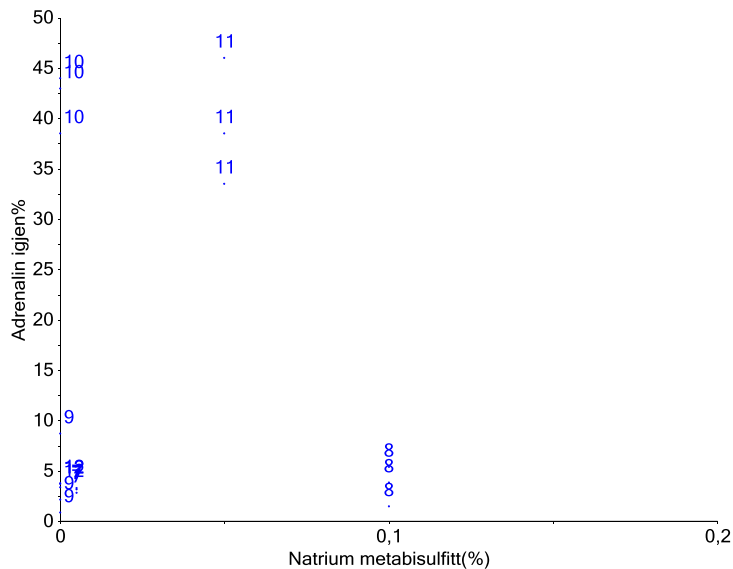
Det må imidlertid utvises varsomhet ved fortolkning av Figur 31. Dette fordi kun 43 % av variasjonen i tetrakaindatamaterialet er forklart (39 % langs Faktor-1 akse og 4 % langs Faktor-2 akse). Mer av variansen i datamaterialet forklares ikke ved å legge til flere faktoraksen. Dette fremgår av Figur 32.



Figur 32: Forklart varians for PLS-modellen vist i Figur 31, Figuren viser både kalibret varians (øvre linje) og validert varians (nedre linje)

b) Stabilitet av adrenalin

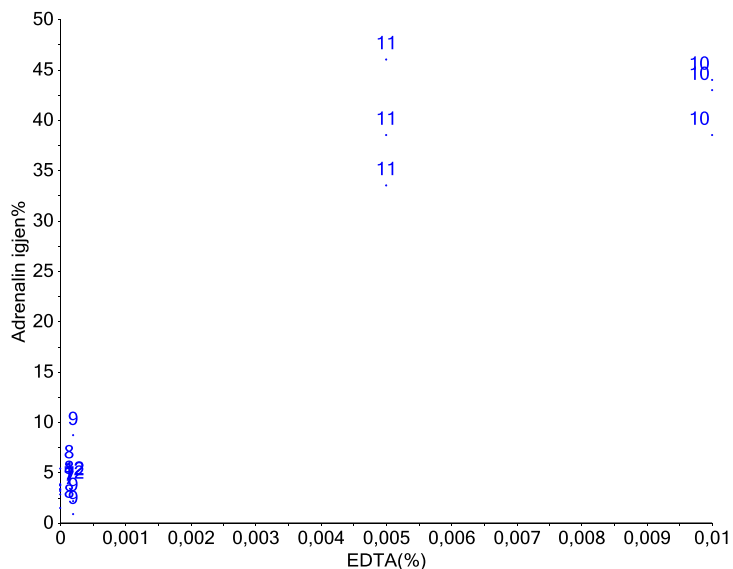
Figur 33 viser et plott av bisulfittkonsentrasjon mot konsentrasjon av adrenalin (% igjen) etter 10 døgn (prøver 1-12 representert i Tabell 41).



Figur 33: Effekt av bisulfitt på stabiliteten av adrenalin ved varmebehandling (prøver 1-12 representert i Tabell 41).

Bisulfitt ser ut til å kunne virke både stabiliserende og destabiliserende på adrenalin (Figur 33). Adrenalin er imidlertid mye nedbrutt og dette gjør tolkning vanskelig.

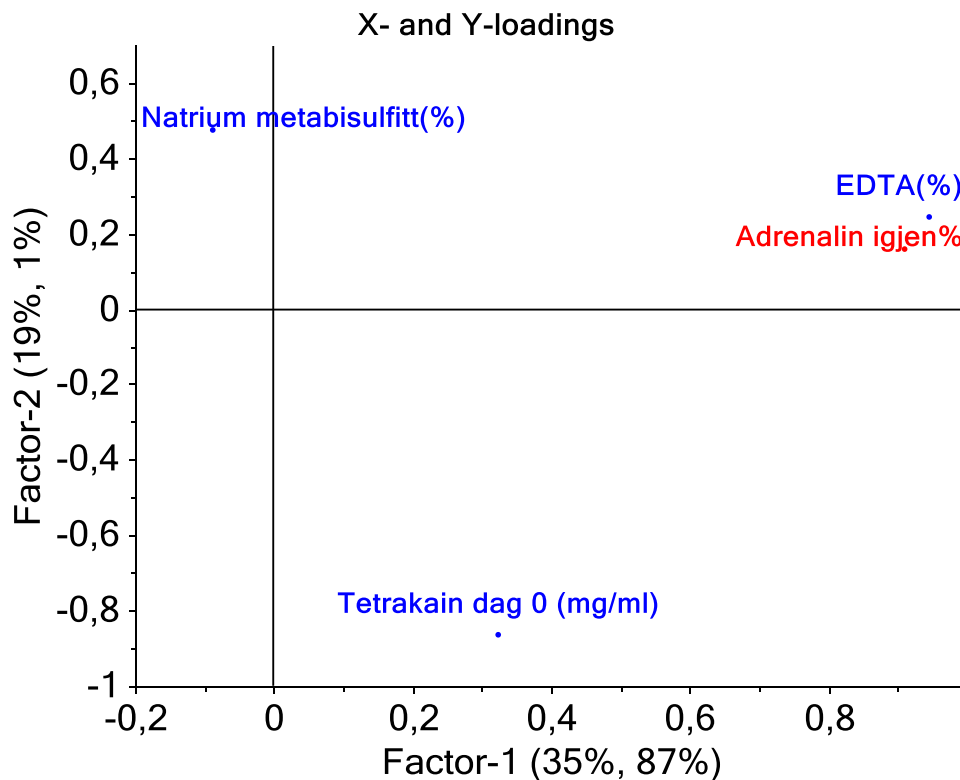
Figur 34 viser et plott av EDTA-konsentrasjon mot konsentrasjon av adrenalin (% igjen) etter 10 døgn (prøver 1-12 representert i tabell 41).



Figur 34: Effekt av EDTA på stabiliteten av adrenalin etter varmebehandling i 10 døgn (prøver 1-12 representert i Tabell 41)

EDTA ser ut til å ha en stabiliserende effekt på adrenalin under varmebehandling (Figur 34).

Figur 35 viser et PLS-plott for stabiliteten av adrenalin etter 10 dagers varmebehandling (prøver 1-12 representert i tabell 41).



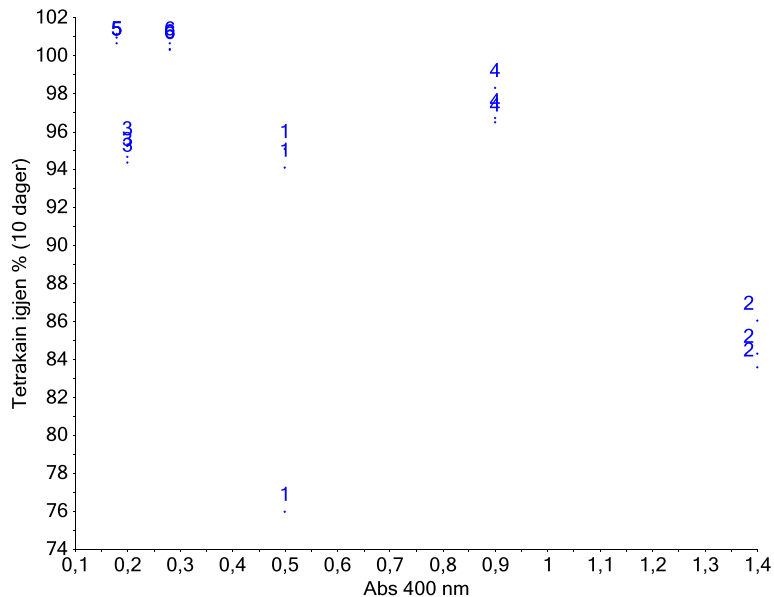
Figur 35: PLS-plott for ulike variablers innvirkning på adrenalins stabilitet over 10 dager med varmebehandling (prøver 1-12 representert i Tabell 41)

Figur 26 viser at EDTA er godt korrelert med adrenalinstabilitet – mer EDTA gir mer adrenalin igjen i prøvene. Bisulfitt er svakt negativt korrelert med adrenalinstabilitet. Plottet av bisulfittkonsentrasjon mot gjenværende mengde adrenalin (Figur W) pekte imidlertid mot at bisulfittet kan ha ulik effekt alt etter konsentrasjon.

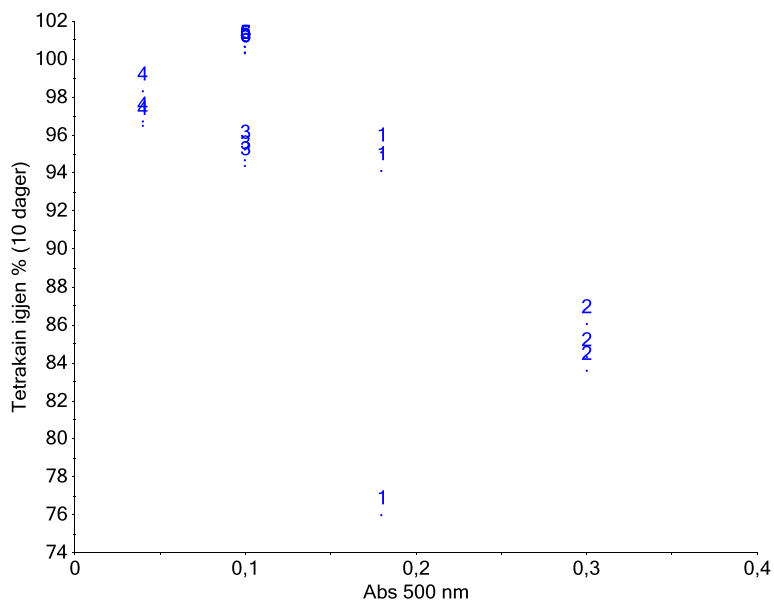
Tetrakainkonsentrasjon kunne variere noe i utgangsløsningen. Dette er satt inn som en variabel i analysen og PLS-plottet viser at høyere utgangskonsentrasjon av tetrakain er svakt positivt korrelert med bedre adrenalinkonsentrasjon.

c) Effekt av nedbrytning og tilstedværelse av adrenalin på misfarging:

Løsninger var misfarget allerede etter 10 døgns lagring Figur 36 og 37 viser et plott av gjenværende tetrakainmengde mot absorbans ved 400 nm og 500 nm (prøver 1-12 representert i tabell 41).



Figur 36: Tetrakainmengde igjen som funksjon av absorbans (Abs) ved 400 nm (prøver 1-12 representert i tabell 41, alle ikke-adrenalinholdige prøver).



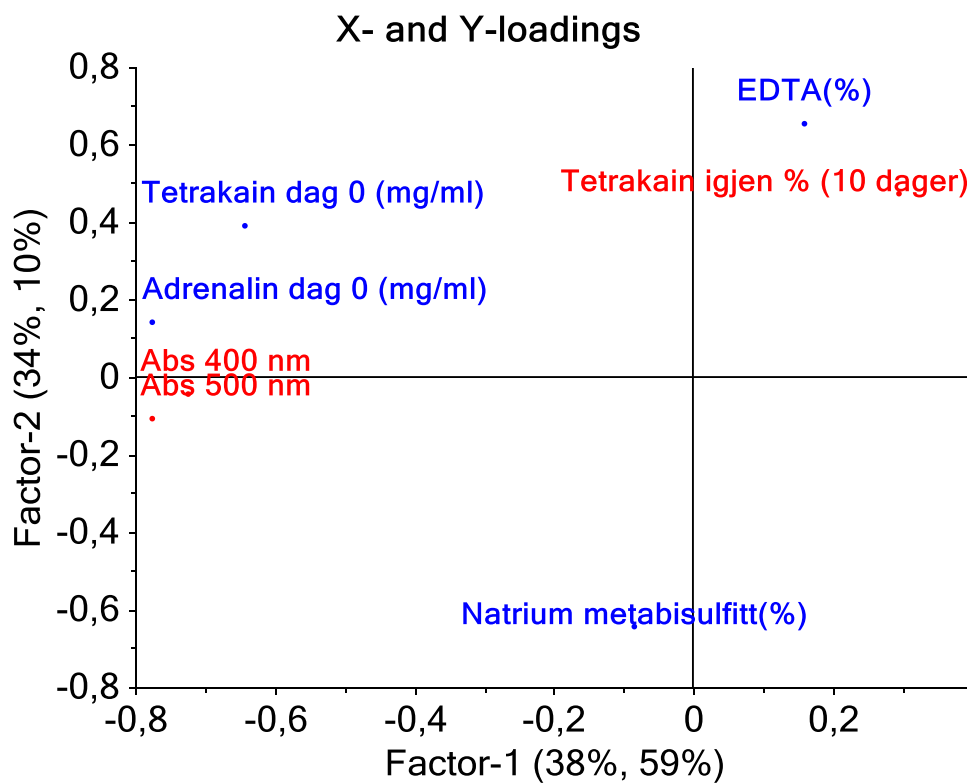
Figur 37: Tetrakainmengde igjen som funksjon av absorbans (Abs) ved 500 nm (prøver 1-12 representert i tabell 41, alle ikke-adrenalinholdige prøver).

Resultatene i figur 36 og 37 viser at tetrakainløsning misfarges ved nedbrytning. Figurene viser at det er betydelig misfarging (absorbans) selv når løsningene er svært lite nedbrutt. Dette peker mot at misfarging til en viss grad er et kosmetisk problem.

Figur 38 viser et PLS-plott for variable og responser etter ti dagers lagring. Absorbans ved 400 og 500 nm er gitt som mål på misfarging. Figuren viser at tetrakainløsninger som er lite nedbrutt har lite misfarging (tetrakain igjen og absorbanser er negativt korrelert). Dette er samme sammenheng som fremgår av de foregående scatter-plottene (Figur 36 og 37).

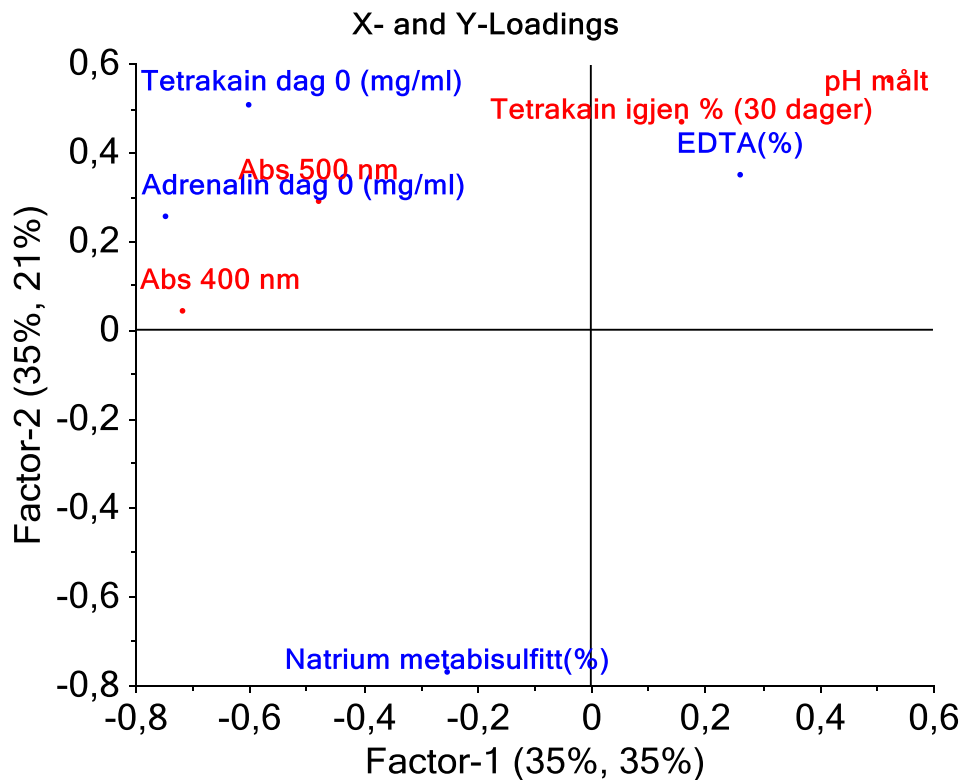
Figur 38 (prøver 1-12 representert i tabell 41) viser også at prøver som inneholdt adrenalin er mer misfarget enn de som ikke inneholdt stoffet.

Til sammen betyr disse to funnene at både tetrakain og adrenalin kan bidra til misfarging.



Figur 38: PLS-plott for ulike variablers innvirkning på farge og tetrakainstabilitet etter 10 dager med varmebehandling (prøver 1-12 representert i tabell 41).

d) Innvirkning på pH:



Figur 39: PLS-plott for ulike variablers innvirkning på farge, tetrakainstabilitet og pH etter 30 dager med varmebehandling (prøver 1-12 representert i tabell 43)

Ved produksjon ble pH i alle løsninger justert til 4. Etter 30 dagers varmebehandling ved 70 °C hadde pH-verdien endret seg noe i prøveløsningene (Tabell 43). Figur 39 sier pH-verdien som respons på ulike variabler (EDTA, bisulfitt, samt tetrakain og adrenalin ved dag 0). Resultatet viser at med økt nedbrytning av tetrakain synker formuleringens pH (høy gjenværende mengde tetrakain er korrelert med høye pH-verdier). pH er svakt positivt korrelert med tetrakainstabilitet (Figur 39, prøver 1-12 representert i tabell 43).

5. KONKLUSJON

Analyse

- Det har latt seg gjøre å utvikle og validere HPLC-analysemetoder for adrenalin og tetrakain i blanding.

Tetrakainstabilitet

- Tetrakainhydroklorid i løsning har best stabilitet mellom pH 4 og 5.
- Tetrakain har stor varmestabilitet.
- Stabiliteten av tetrakain er relativt sett best ved en konsentrasjon av bisulfitt på 0,05 %. Dårligere stabilitet sees både ved lavere og høyere konsentrasjon av tilsetningsstoffet.
- Stabiliteten av tetrakain kan være svak når løsningene er uten EDTA eller inneholder lite EDTA (0,0002 %). Stabiliteten er bedre – og jevn – når løsningene inneholder 0,005 % EDTA eller mer.
- Utgangskonsentrasjonene av adrenalin og tetrakain har lite positiv eller negativ korrelasjon med gjenværende mengde tetrakain etter varmebehandling og har sannsynligvis liten betydning for stabiliteten.
- Med økt nedbrytning av tetrakain synker formuleringens pH (høy gjenværende mengde tetrakain er korrelert med høye pH-verdier). pH er svakt positivt korrelert med tetrakain stabilitet

Adrenalinstabilitet

- Bisulfitt ser ut til å kunne virke både stabiliserende og destabiliserende på adrenalin alt etter konsentrasjon.
- EDTA ser ut til å ha en stabiliserende effekt på adrenalin.

Misfarging

- Både tetrakain og adrenalin kan bidra til misfarging av en tetrakain-adrenalinblanding.
- Tetrakainløsninger blir mest misfarget ved lav pH – det er også ved lav pH at nedbrytningen av tetrakain er størst. Misfargingen avtar selv om nedbrytningen av tetrakain tilsynelatende øker igjen ved den høyest undersøkte pH-verdien, pH 6. Ved høyere pH ser man imidlertid mer utfelling. Når misfargingen – i form av absorbans

ved 400 og 500 nm – avtar ved høy pH kan dette skyldes at nedbrytningsprodukter feller ut og at den gjenværende væsken blir relativt klar.

- Tetrakainløsning misfarges ved nedbrytning. Det er betydelig misfarging selv når løsningene er svært lite nedbrutt. Dette peker mot at misfarging til en viss grad er et kosmetisk problem.

Forslag til videre arbeid

Effekten av degassing med nitrogen bør studeres. Degassing med nitrogen kan virke stabiliserende og ha gunstig effekt på stabilitet og misfarging.

Det bør utføres flere akselererte stabilitetsstudier for å undersøke effekten av degassing.

6. REFERANSER

Alberts, G., F. Boomsma, A. J. Man in 't Veld and M. A. H. Schalekamp. (1992) Simultaneous determination of catecholamines and dobutamine in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 583: s.236-240

Aulton, M. E. (2001) *Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design*, Churchill Livingstone, Toronto.

Baran, H., G. Schwedt (1993) Identifizierung von Epinephrin (Adrenalin)-Zersetzungsprodukten in Infusionslösungen mittels HPLC und Multidetektion. *Pharmazie* 48: s.273-275

Balch JF, B. P. (1990) *Prescription for nutritional healing: A practical A-Z reference to drug free remedies using vitamins, minerals, herbs & food supplements*, Garden City Park, Avery Publishing, New York

British Pharmacopoeia (2005).

Brustugun, J. (2004) Photostability of epinephrine - the influence of bisulfite and degradation products. *Pharmazie* 59: s.457-463

Brustugun, J. (2005). Photostability of catecholamines in infusion solutions, Faculty of mathematics and natural sciences, University of Oslo, Oslo,

Brustugun, J.. *Prosedyre for validering av metoder for HPLC-analyse*. P-TLV-A-031. Sykehusapoteket ved Rikshospitalet. (2010)

Chandran, S., 1, R. S. P. Singh (2007) Comparison of various international guidelines for analytical method validation. *Pharmazie* 62: s.4-14.

Chin, J. R. L. (1992). Determination of the catecholamines and serotonin, their precursors tyrosine and tryptophan, and their main metabolites in rat brain using reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorimetric and oxidative amperometric detection in series. *Journal of Chromatography: Biomedical Applications* 578: s.17-30.

Clarke, G. S. (1994) The validation of analytical methods for drug substances and drug products in UK pharmaceutical laboratories. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 12: s.643-652.

Connors, k. A. (1986). *Chemical stability of pharmaceuticals; a Handbook for pharmacists*. 2.utgave. John Wiley & Sons, New York.

European Pharmacopoeia (2010), Council of Europe. 6.utgave, Starsbourg, France.

Felleskatalogen (2010).

H. P. Rang, M. M. D., J.M. Ritter, P.K. Moore (2003). *Farmakologi*, Churchill Livingstone, Toronto.

International Conference of Harmonization (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1).

Juenge, E. C., Paul E. Flinn and William b. Furman (1982) Liquid chromatographic separation and detection of epinephrine and its oxidation products, adrenochrome and adrenolutin *Journal of Chromatography A* 248: s.297-302.

Kang, L. (2003) Formulation and Efficacy Studies of New Topical Anesthetic Creams. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 29: s.505-512.

Kirchhoefer, R., D., Larry K. Thornton, and James F. Allgire (1986) Stability of sterile aqueous epinephrine injections submitted by U.S hospitals. *American Journal of Hospital Pharmacy* 43: s.1741-1746.

Lloyd, A. M. H. J. S. A. W. (2002). *Drug Delivery and Targeting: For Pharmacists and Pharmaceutical Scientists [Paperback]*. Taylor & Francis, London.

Loyd, V. A., JR., M. Lou Stiles, DA Peng Wang, Yu-Hsing Tu (1993) Stability of bupivacaine hydrochloride, epinephrine hydrochloride, and fentanyl citrate in portable infusion-pump reservoirs. *American journal of hospital pharmacy* 50: s.714-715.

N. J. de Mol, G. M. J. B. v. H., K. W. Gerritsma (1979) Photodecomposition of catecholamines. photoproducts, quantum yields and action spectrum of adrenaline. *Photochemistry and Photobiology* 29: s.7-12.

Nema, S., R. J. Washkuhn (2002). Excipients- their role in parenteral dosage forms I: J. Swarbrick (Ed.). *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. 2.utgave. Marcel Dekker, Inc, New York.

Nema, S., R. J. Washkuhn, R.J. Brendel (1997) Excipients and their use in injectable products. *Journal of Pharmaceutical Science and technology* 51: s.166-171.

Norsk legemiddelhåndbok (2010).

Parfitt, K. (1999). *Martindale: The Complete Drug Reference* 32.utgave Pharmaceutical Press, London.

Parker, S. (2008) *Menneskets anatomi og fysiologi*, Damm, Oslo

Rasmussen, S. P.-B. K. E. (2004). *Legemiddelanalyse*, Fagbokforlaget, Bergen

Sattler, A., J. Jage² and I, Krämer¹ (1998) Physico-chemical stability of infusion solution for epidural administration containing fentanyl and bupivacaine or lidocaine. *Pharmazie*. 53: s.386-391.

Shabir, G. A. (2002) Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A* 987: s.57-66.

Sidney Riegelman, E. Z. F. (1962) Effect of boric acid and bisulfite on the rate of oxidation of epinephrine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 51: s.210-213.

Silverman, R. B. (2004) *The organic chemistry of drug design and drug action*. Academic Press, USA

Waraszkiewicz, S. M., E. A. Milano, R. Dirubio (1981) Stability-indicating high-performance liquid chromatographic analysis of lidocaine hydrochloride and lidocaine hydrochloride with epinephrine injectable solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 70: s.1215-1218.

Wilson, T., Forde, MD. (1990) Stability of milrinone and epinephrine, atropin sulfate, lidocaine hydrochloride, or morphine sulfate injection. *American journal of hospital pharmacy* 47: s.2504-2507.

7. VEDLEGG

Tabell 44: HPLC-metodeutvikling (utvikling av felles analysemetode for adrenalin og tetrakain)

Discovery® HS C18, 3 µm, 15 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Detektor nm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t Adr. min	R _t Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
1	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (80:20% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	2	-	Tetrakain ble ikke eluert
2	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (50:50% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	3,5	Adrenalin ble eluert med væskefronten
3	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (65:35% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	6,4	Adrenalin ble eluert med væskefronten
4	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,7	45	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Ingen retensjon
5	0,001 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Interferens med uskjent topp
6	0,001 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (92:8% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmebehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 45: HPLC-metodeutvikling (utvikling av felles analysemetode for adrenalin og tetrakain)

Synergi 4 µm Fusion-RP 80Å, 150 x 4.6 med mer										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Detektor mm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
7	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (80:20% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	3,8	-	Tetrakain ble ikke eluert
8	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (80:20% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	1,8	-	Tetrakain ble ikke eluert

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmerbehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 46: HPLC-metodeutvikling (utvikling av felles analysemetode for adrenalin og tetrakain)

SUPELCOSIL® LC-DP, 5 µm, 10 cm x 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Deteksjon. mm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
9	0,005MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (80:20% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	3	-	Tetrakain ble ikke eluert
10	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (50:50% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	2,8	-	Tetrakain ble ikke eluert
11	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (30:70% v/v)	1,0	25	280	20	-	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Tetrakain ble ikke eluert

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmerbehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 47: HPLC-metodeutvikling (utvikling av felles analysemetode for adrenalinn og tetrakain)

SUPELCOSIL® LC8, 5 µm, 15 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	T °C	Det. mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t Adr. min	R _t Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
12	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (80:20% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	5,5	-	Tetrakain ble ikke eluert
13	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (50:50% v/v)	1,0	25	280	20	0,02	0,016	Ferske prøver	Iso.	3,6	-	Tetrakain ble ikke eluert
14	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (10:90% v/v)	1,0	25	280	20	-	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Tetrakain ble ikke eluert
15	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (25:75% v/v)	1,0	25	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	4,8	-	Tetrakain ble ikke eluert
16	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (25:75% v/v)	2,0	45	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	2,5	10	Økt Temp. og Flow ga eluering
17	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (35:65% v/v)	2,0	45	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	2,5	8	Økt Temp. og Flow ga eluering
18	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (30:70% v/v)	1,7	45	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	2,8	8,4	Økt Temp. og Flow ga eluering
19	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,4	45	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	3,8	-	Tetrakain ble ikke eluert
20	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,4	45	280	20	0,2	-	Ferske prøver	Iso.	3,8	-	↓Flow fører til ↑ R _t Adr.
21	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,7	45	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Ingen eluering
22	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (70:30% v/v)	1,0	45	280	20	-	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	1,7	Tilsetting av 0,03M TEA ga ↓ R _t Tet.
23	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (93:7% v/v)	1,0	26	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Ingen eluering
24	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:MeOH(90:10% v/v)	1,0	22,6	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Ingen eluering
25	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:MeOH(75:25% v/v)	1,0	22,6	280	20	0,2	0,016	Ferske prøver	Iso.	-	-	Alle stoffene ble eluert samtidig etter 19,5 min

Tabellen fortsetter neste side

SUPELCOSIL® LC8, 5 µm, 15 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	T °C	Det. mm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
26	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,4	45	280	20	0,2	0,016	Var.beh.	Iso.	4	9	Interferens med ukjent topp
27	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (15:85% v/v)	2,0	45	280	20	0,2	0,016	Var.beh.	Iso.	4,2	7,5	Interferens med ukjent topp
28	0,005 M KH ₂ PO ₄ , 0,03M TEA pH3,6:ACN (35:65% v/v)	1,4	45	280	20	0,2	0,016	Var.beh.	Iso.	3,9	7,6	Interferens med ukjent topp
29	0,005M KH ₂ PO ₄ ,0,03M TEA pH3,6:MeOH:ACN (25:45:30% v/v)	1,7	45	280	20	0,2	0,016	Var.beh.	Iso.	3,0	6,4	Interferens med uskjent topp
30	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,7	45	280	20	0,2	-	Ferske prøver	Iso.	3,2	6,5	↓Flow fører til ↑ R _t .Adr.
31	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (25:75% v/v)	1,5	45	280	20	0,2	-	Ferske prøver	Iso.	2,7	7,5	↓Flow fører til ↑ R _t .Adr. og R _t .Tet.
32	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (35:65% v/v)	1,5	45	280	20	0,2	-	Ferske prøver	Iso.	3	8,5	↓ACN fører til ↑ R _t .Adr. og R _t .Tet.

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmerbehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 48: HPLC-metodeutvikling (utvikling av analysemetode for adrenalin og tetrakain)

Ascentis® Express HILIC, 2.7 µm, 15 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.eksjon mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
33	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (30:70% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,5	-	Lite retensjon, interferens
34	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (40:60% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,7	-	Lite retensjon, interferens
35	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (10:90% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	7,5	-	Stor retensjon, asymmetrisk topp
36	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (10:90% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5,3	-	Stor retensjon, Asymmetrisk topp
37	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (15:85% v/v)	1,5	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,7	-	Asymmetrisk topp
38	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (15:85% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,2	-	Asymmetrisk topp
40	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (30:70% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,6	-	Interferens med ukjent topp
41	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (30:70% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med uskjent topp
42	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (10:90% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
43	MeOH 100%	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Interferens med ukjent topp
44	ACN:MeOH(50:50% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	10	-	Interferens med ukjent topp

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmerbehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 49: HPLC-metodeutvikling (utvikling av analysemetode for adrenalin og tetrakain)

Discovery® Cyano, 5 µm, 25 cm × 4.6 mm											Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.eksjon mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon	
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling					
45	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (5:95% v/v)	1,0	23	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5,5	-	Interferens med ukjent topp	
46	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (10:90% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,1	-	Lite retensjon, interferens med ukjent topp	
47	Gradient: 90-40% ACN :Buffer 0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6 i 8min,	3,0	24	280	20	0,02	1,5	Var.beh.	Grad.	3		Interferens med ukjent topp	
48	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (5:95% v/v)	2,0	43	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5	-	Interferens med ukjent topp	
49	100% ACN	2,0	43	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,7	-	Lite retensjon, interferens med ukjent topp	
50	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (10:90% v/v)	1,5	43	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,5	-	Interferens med ukjent topp	
51	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	1,0	43	280	20	0,02	0,01	Var.beh.	Iso.	4,5	15	Interferens med ukjent topp	
52	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	17	-	Stor retensjon, bred topp	
53	100% buffer 0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,5	-	Interferens med ukjent topp	
54	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	6,5	-	Stor retensjon, bred topp	
55	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,5	-	Interferens med ukjent topp	
56	0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6 :MeOH (85:15% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4	-	Interferens med ukjent topp	
57	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	0,016	Var.beh.	Iso.	2,5	15	Interferens med ukjent topp	

Tabellen fortsetter neste side

Discovery® Cyano,5 µm, 25 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.eksjon mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
58	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (95:5% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,2	-	Interferens med ukjent topp
59	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (95:5% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,7	-	Interferens med uskjent topp
60	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (98:2% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4	-	Interferens med ukjent topp
61	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (98:2% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3	-	Interferens med ukjent topp
62	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (98:2% v/v)	2,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
63	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (98:2% v/v)	1,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,7	-	Interferens med ukjent topp
64	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (98:2% v/v)	0,5	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	7,5	-	Interferens med ukjent topp
65	100% buffer 0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,9	-	Interferens med ukjent topp
66	100% buffer 0,015 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	0,5	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
67	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,9	-	Interferens med ukjent topp
68	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Interferens med ukjent topp
69	100% Vann pH3	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Interferens med ukjent topp

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmedehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 50: HPLC-metodeutvikling (utvikling av analysemetode for adrenalin og tetrakain)

Discovery® Cyano, 5 µm, 3 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Detektor nm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t Adr. min	R _t Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
70	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (40:60% v/v)	1,5	24	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,9	-	Interferens med ukjent topp
71	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (15:85% v/v)	1,5	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3	-	Interferens med ukjent topp
72	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (35:65% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
73	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (30:70% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
74	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (10:90% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
75	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (5:95% v/v)	1,0	23	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1	-	Interferens med ukjent topp
76	MeOH 100%	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Interferens med ukjent topp
77	ACN:MeOH(50:50% v/v)	1,0	35	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	10	-	Stor retensjon, ikke symmetrisk topp

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmebehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 51: HPLC-metodeutvikling (utvikling av analysemetode for adrenalin og tetrakain)

SUPELCOSIL [®] LC-8 HPLC Column 5 µm particle size, L × I.D. 25 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Detektor mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _e .Adr. min	R _e .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
78	0,025 MKH ₂ PO ₄ , K ₂ HPO ₄ pH6,9:MeOH (30:70% v/v)	1,0	45	310	20	0,02	0,016	Gammel Tet. Prøve speiket med adr.	Iso.	3,1	7,9	Tetrakain toppen er skarp og symmetrisk, god separasjon (metoden ble valgt som tetrakains analyse metode)
79	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (15:85% v/v)	1,5	45	220	20	0,02	0,016	Gammel tet. Prøve speiket med adr.	Iso.	5,2	10	Denne metoden var tilsynelatende velfungerende, under valideringen ble det oppdaget at adrenalin toppen er ikke ren nok (dårlig resolusjon)
80	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH4:MeOH (15:85% v/v)	1,5	50	280	20	0,02	0,016	Gammel tet. Prøve spiket med adrenalin.	Iso.	2	10	Adrenalin toppen er ikke ren nok, dårlig resolusjon
81	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH4:MeOH (85:15% v/v)	1,5	50	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Adrenalin toppen er ikke ren nok, dårlig resolusjon
82	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH4:MeOH (90:10% v/v)	1,0	50	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	7,5	-	Adrenalin toppen er ikke ren nok, stor toppbredde, dårlig resolusjon
83	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH4:MeOH:ACN (80:15:5% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Adrenalin toppen er ikke ren nok, dårlig resolusjon

Tabellen fortsetter neste side

SUPELCOSIL [®] LC-8 HPLC Column 5 µm particle size, L × I.D. 25 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Detektor mm	Injeksjons..v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _c .Adr. min	R _c .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
84	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (88:12 % v/v)	1,5	23	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5	-	Adrenalin toppen er ikke rent nok, dårlig resolusjon
85	0,005 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (90:10% v/v)	1,5	50	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Adrenalin toppen er ikke rent
86	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (85:15% v/v)	2,0	50	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,2	-	Adrenalin toppen er ikke rent
87	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (85:15% v/v)	2,0	23	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,2	-	Adrenalin toppen er ikke rent
88	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (15:85% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,5	-	Interferens med ukjent topp
89	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (5:95% v/v)	1,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Interferens med ukjent topp
90	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (10:90% v/v)	2,0	25	280 310	20	0,02	0,016	Gammel Tet. Prøve spiket med Adr.	Iso.	3,2	6	Adrenalin toppen er ikke ren
91	0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	6	6	Adrenalin toppen er ikke ren
92	Vann pH3:MeOH (85:15 % v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	21	-	Stor retensjon, bred topp
93	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (85:15% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,2	-	Interferens med ukjent topp
94	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,5	-	Interferens med ukjent topp
95	0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,7	-	Interferens med ukjent topp

Tabellen fortsetter neste side

SUPELCOSIL® LC-8 HPLC Column 5 µm particle size, L × I.D. 25 cm × 4.6 mm										Resultat		
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.ektor nm	Injeksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _i Adr. min	R _i Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
96	0,0075 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3	-	Interferens med ukjent topp
97	0,0075 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (85:15% v/v)	2,0	25	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,6	-	Interferens med ukjent topp
98	0,0075 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,5	-	Interferens med ukjent topp
99	0,0035 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5	-	Interferens, stor retensjon, bred topp
100	0,0035 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (85:15% v/v)	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,2	-	Interferens med ukjent topp
101	0,0035 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:CAN (90:10% v/v)	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,6	-	Interferens med ukjent topp
102	0,0025MKH ₂ PO ₄ pH3,6:CAN (90:10% v/v)	2,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Interferens med ukjent topp
103	0,0025MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	6	-	Interferens med ukjent topp
104	0,0025MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	2,0	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,6	-	Interferens med ukjent topp
105	0,0025MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (92:8% v/v)	2,0	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	5,2	-	Interferens med ukjent topp
106	0,0025MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (88:12% v/v)	2,0	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,5	-	Interferens med ukjent topp
107	0,0035MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (88:12% v/v)	2,0	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Interferens med ukjent topp
108	0,0015MKH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (92:8% v/v)	2,5	45	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,2	-	Interferens med ukjent topp
109	0,0015 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:ACN (20:80% v/v)	2,5	45	280	20	0,02	0,016	Var.beh.	Iso.	1,5	2,5	Interferens med ukjent topp
110	0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (15:85% v/v)	1,8	20	280	20	0,02	0,016	Var.beh.	Iso.	3,1	5	Interferens med ukjent topp

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_i= Retensjonstid, Var.beh.= Varmebehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 52: HPLC-metodeutvikling (utvikling av analysemetode for adrenalin)

ZORBAX SB-C3 5um, 4.6 x 250mm									Resultat			
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.eksjon mm	Inj.eksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t Adr. min	R _t Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
111	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (95:5% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2	-	Lite retensjon
112	0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6:MeOH (90:10% v/v)	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,1	-	Lite retensjon
113	100% buffer 0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,2	-	Lite retensjon
114	100% buffer 0,0075 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,4	-	Lite retensjon
115	100% buffer 0,0025 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	1,8	-	Lite retensjon
116	100% buffer 0,05 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	2,0	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	2,3	-	Lite retensjon
117	100% buffer 0,05 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,5	22	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,2	-	Bra retensjon, ren skarp topp
118	100% buffer 0,05 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,0	18	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,8	-	Bra retensjon, ren skarp topp
119	100% buffer 0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	4,5	-	Bra retensjon, ren skarp topp
120	100% buffer 0,01 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,3	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,5	-	Bra retensjon, ren skarp topp
121	100% buffer 0,015 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,3	12	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3,6	-	Bra retensjon, ren skarp topp

Tabellen fortsetter neste side

ZORBAX SB-C3 5um, 4.6 x 250mm									Resultat			
Forsøk no.	Mobilfase MeOH= Metanol ACN= Acetonitril	Flow ml/min	Temperatur °C	Det.eksjon nm	Inj.eksjons.v. µl	Prøve			Eluering (Grad./Iso.)	R _t .Adr. min	R _t .Tet. min	Observasjon
						[Adr.] mg/ml	[Tet.] mg/ml	Behandling				
122	100% buffer 0,02 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,0	15	280	20	0,02	-	Var.beh.	Iso.	3	-	Bra retensjon, ren skarp topp
123	Eluering: 0,01-5min Mobilfase: 100 % buffer 0,015 M KH ₂ PO ₄ pH3,6 Overgang til vask: 5,01-7 min Vask: 5,01-21 min Vaskeløsning: Vann : Metanol (30:70 %v/v) Ekviblering: 21-25 min 100 % buffer 0,015 M KH ₂ PO ₄ pH3,6	1,3	15	280	20	0,02	0,016	Var.beh.	Grad.	3,5	9	Bra retensjon, ren skarp adrenalin topp (denne metoden ble valgt som adrenalin analyse metode)

Adr.= Adrenalin, Tet= Tetrakain, R_t= Retensjonstid, Var.beh.= Varmerbehandlet, Iso. = Isokratisk, Grad.= Gradient, TEA= Trietylamin, T= temperatur

Tabell 53: Beregninger av pHp (utfellings pH) for tetrakainhydroklorid

<p>Tetrakain Hydroklorid Molekylvekt: 300.8 g/mol pKa: 8,39 <u>Løselighet:</u> 1 i 7,5 del vann ved 20 °C</p>	<p>Tetrakain Molekylvekt: 264.4 g/mol <u>Løselighet:</u> “Very slightly soluble in water” ved 20 °C 1g i 10 000ml = 3.8×10^{-4} M 1g i 1000ml = 3.8×10^{-3} M Tetrakain 16 mg/ml = Tetrakain-HCl 18.2 mg/ml = 0.0605 M</p>
<p>$pHp = pKa + \log [base]/[salt]$ $[base] + [salt] = 100\%$</p>	
<p>Tetrakain løselighet 1g i 10 000 ml 3.80×10^{-4} M / 0.0605 M = 0.63% → felling pHp = 8.39 + log 0.63/99.37 = <u>6.20</u></p>	<p>Tetrakain løselighet 1g i 1000 ml 3.8×10^{-3} M / 0.0605 M = 6.30% → felling pHp = 8.39 + log 6.3/93.7 = <u>7.21</u></p>