

Anna Saur

# Frisettingstesting av hele, delte og knuste teofyllin depottabletter

Innledende metodeutvikling med USP apparat 4 og analyse med HPLC-UV

Masteroppgave i Master i farmasi

Veileder: Daniel Zeiss

Oktober 2023



Anna Saur

# **Frisettingstesting av hele, delte og knuste teofyllin depottabletter**

Innledende metodeutvikling med USP apparat 4 og analyse med HPLC-UV

Masteroppgave i Master i farmasi  
Veileder: Daniel Zeiss  
Oktober 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for medisin og helsevitenskap  
Institutt for klinisk og molekylær medisin



Kunnskap for en bedre verden



# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag .....</b>	<b>4</b>
<b>English summary.....</b>	<b>4</b>
<b>1. Introduksjon .....</b>	<b>6</b>
1.1 Manipulering av orale faste legemiddelformuleringer.....	6
1.2 Oppløsningsprosessen, legemiddelfrigjøring og absorpsjon av legemidler fra faste orale doseringsformer	8
1.3 Depottabletter og hensikt.....	10
1.4 Oppbygging og typer depottabletter.....	10
1.5 Theo-Dur.....	11
1.6 Frisettingstester av faste orale faste legemiddelformer.....	13
1.6.1 Metoder for biorelevante <i>in vitro</i> frisettingstester .....	14
1.6.2 Apparat 4 .....	15
1.7 Høypresisjonsvæskekromatografi (HPLC).....	17
1.7.1 HPLC med UV-deteksjon .....	17
1.7.2 Omvendtphase HPLC med C18-kolonne og UV-deteksjon .....	18
1.8 Hensikten med prosjektet og problemstilling .....	20
<b>2. Materialer og metode .....</b>	<b>21</b>
2.1 Løsninger fra pulver av teofyllin .....	21
2.1.1 Stamlløsning av teofyllin fra teofyllin monohydrat .....	21
2.1.2 Stamlløsning av teofyllin fra teofyllin anhydrat.....	21
2.1.3 Andre løsninger av teofyllin fra teofyllin anhydrat .....	21
2.1.4 Tillaging av standardløsninger fra stamlløsning teofyllin monohydrat .....	21
2.1.5 Tillaging av standardløsninger fra stamlløsning teofyllin anhydrat .....	22
2.1.6 Løsning av teofyllin fra Theo-Dur® 300 mg depottabletter .....	22
2.2 Frisettingstest (FST) av Theo-Dur® depottabletter i apparat og prosessparameterne.....	23
2.2.1 Oppsett av gjennomstrømningsceller (Flow-through cell; FTC) .....	25
2.2.2 Håndtering av depottabletter før frisettingstest i apparat 4 .....	27
2.2.3 Etterbehandling og analyse av prøver fra frisettingstester (FST) i apparat 4 .....	28
2.3 HPLC.....	28
2.3.1 Utstyr .....	28

2.3.2 Kalibrering.....	29
2.4 Databehandling av resultater.....	30
<b>3. Metodeutvikling .....</b>	<b>31</b>
3.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent .....	31
3.1.1 Kartlegging av bølgelengde for maksimal UV-absorbans for teofyllin.....	31
3.1.2 Isokratisk elueringsmetode: Deteksjon av teofyllin og kartlegging av mobilfasesammensetting .....	31
3.1.3 Undersøkelse av linearitet (håndteringsanalyse 1) .....	32
3.1.4 Håndteringsanalyse 2: Undersøkelse av linearitet, forsøk repetert .....	33
3.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4 .....	33
3.2.1 Utprøving av ny HPLC-kolonne og gradient elueringsmetode.....	33
3.2.2 Etablering av lineært måleområde og kalibrering av HPLC .....	34
3.2.3 Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett .....	35
3.2.4 Frisettingstester i apparat 4, av hel og delt depottablett med fortytning av prøvene .....	36
3.2.5 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle.....	37
3.2.6 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortytning av prøver .....	38
3.3 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4 .....	39
3.3.1 Triplett frisettingstest av hele og delte depottabletter .....	40
3.3.2 Triplett frisettingstest av knuste depottabletter .....	40
3.4 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode.....	42
3.4.1 Undersøkelse av stabilitet til løsninger med teofyllin .....	42
3.4.2 Recovery-forsøk: Evaluering av analysemetodens nøyaktighet .....	43
3.4.3 Bestemmelse av mengde teofyllin i Theo-Dur® Depottabletter i HPLC-UV.....	44
3.4.4 Undersøkelse av sprøytefiltrering.....	45
<b>4. Resultater .....</b>	<b>47</b>
4.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent .....	47
4.1.1 Kartlegging av bølgelengde for maksimal UV-absorbans for teofyllin.....	47
4.1.2 Isokratisk elueringsmetode: Deteksjon av teofyllin og kartlegging av mobilfasesammensetting .....	47
4.1.3 Undersøkelse av linearitet (håndteringsanalyse 1) .....	47
4.1.4 Håndteringsanalyse 2: Undersøkelse av linearitet, forsøk repetert .....	47
4.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4 .....	48
4.2.1 Utprøving av ny HPLC-kolonne og gradient elueringsmetode.....	48
4.2.2 Etablering av lineært måleområde og kalibrering av HPLC .....	49
4.2.3 Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett .....	49

4.2.4 Frisettingstester i apparat 4, av hel og delt depottablett med fortynning av prøvene .....	50
4.2.5 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle.....	51
4.2.6 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortynning av prøver .....	52
<b>4.3 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4.....</b>	<b>52</b>
4.3.1 Triplett frisettingstest av hele og delte depottabletter .....	52
4.3.2 Triplett frisettingstest av knuste depottabletter .....	54
<b>4.4 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode.....</b>	<b>57</b>
4.4.1 Undersøkelse av stabilitet til løsninger med teofyllin .....	57
4.4.2 Recovery-forsøk: Evaluering av analysemetodens nøyaktighet .....	58
4.4.3 Bestemmelse av mengde teofyllin i Theo-Dur® Depottabletter i HPLC-UV.....	58
4.4.4 Undersøkelse av sprøytefiltrering.....	59
<b>5. Diskusjon .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1 Forsøk, Resultater og vurderinger gjort underveis .....</b>	<b>62</b>
5.1.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent.....	62
5.1.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4.....	63
5.1.3 Frisettingstester i apparat 4 og analyse av prøver i HPLC-UV.....	65
5.1.4 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4.....	68
5.1.5 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode .....	71
<b>5.2 Noen av hovedutfordringene gjennom prosjektet.....</b>	<b>73</b>
5.2.1 Utvikling av metode for HPLC-analyse.....	73
5.2.2 Utvikling av frisettingstester i apparat 4.....	74
5.2.3 Frisettingstest av knuste depottabletter i apparat 4 .....	74
5.2.4 Normalitet i resultatene fra de triplette FST .....	77
<b>5.3 Videre arbeid .....</b>	<b>77</b>
5.3.1 Drøfting av prosjektet, behov for metode og videre forskning .....	78

## Sammendrag

Målet i dette masterprosjektet var opprinnelig å utvikle en frigjøringsstest for hele, delte og knuste teofyllin depottabletter i USP 4 apparat (flow through cell) under simulerte gastrointestinale betingelser og tilhørende metode for HPLC-analyse av prøvene. Bakgrunnen for utviklingen av metoden var ønsket om å innhente mer kunnskap om hvordan knusing og deling av faste orale doseringsformer med modifisert frisetting kan påvirke frisettingsprofilen av virkestoffet. Betydelige utfordringer oppsto underveis i arbeidet med dette prosjektet, og det som denne masteroppgaven beskriver er en innledende metodeutvikling. Prosjektet har likevel en verdi som følge av at den belyser en rekke av utfordringene i utviklingen av både disse metodene. Flere av utfordringene må utredes nærmere for å optimalisere det videre metodeutviklingsarbeidet i dette forskningsprosjektet.

## English summary

The aim of this master's project was originally to develop a dissolution test for whole, split, and crushed theophylline extended-release tablets in USP 4 apparatus (flow through cell) under simulated gastrointestinal conditions and associated method for HPLC analysis of the samples. The background for the development of the method was the desire to obtain more knowledge about how crushing and splitting solid oral dosage forms with modified release can affect the dissolution profile of the active pharmaceutical ingredient (API). Significant challenges arose during the work on this project, and what this master's thesis describes is an initial method development. The project nevertheless has value in that it highlights several of the challenges in the development of both these methods. Several of the challenges need to be investigated further to optimize the further method development work in this research project.



## Forord

Takk til veileder Daniel Zeiss og Nord universitet for at jeg fikk utføre masterprosjekt i Namsos.

Takk til alle på farmasigangen for god hjelp og ikke minst all støtte gjennom dette året. En spesiell takk til Einar Egeland for deling av sine kromatografikunnskaper, praktisk hjelp med HPLC og motivasjonssamtaler og til Hanne Kristine Lundahl Kjelbotn for alltid ha vært engasjert i å finne løsninger, du har lært meg så mye.

Namsos, 1. oktober 2023

Anna Saur

# 1. Introduksjon

## 1.1 Manipulering av orale faste legemiddelformuleringer

Den vanligste måten legemidler inntas på er gjennom munnen (peroral administrasjon) og blant de mest brukte formuleringene er orale faste doseringsformer (OFDF) (1,2).

Innenfor OFDF finnes et stort utvalg av ulike formuleringer/design, fra enkle konvensjonelle tabletter med umiddelbar frisetting av virkestoff til avanserte formuleringer som kontrollerer frisettingshastigheten eller lokasjonen for frisettingen av virkestoffet (modifisert frisetting). I 2021 ble det funnet at størstedelen av OFDF (87%) som er markedsført i Norge har en umiddelbar frisetting av virkestoffet fra doseringsformen, mens 14 % hadde en modifisert frisetting av virkestoff. De fleste OFDF med modifisert frisetting var tabletter (62%).

Flertallet av preparatomtalene for tablettene med modifisert frisetting informerer om at tablettene skal svelges hel (i 78% av tilfellene), ikke kan knuses (75% av tilfellene), ikke tygges (80% av tilfellene), ikke deles (56% av tilfellene). Fåtallet av preparatomtalene (13%) informerte om at deling var greit for denne typen tabletter (1).

Resultater fra ulike studier viser at manipulering av orale faste doseringsformer (OFDF), eksempelvis deling og knusing av tabletter, er et utbredt fenomen. Det gjøres i mange situasjoner; på sykehus, på institusjoner og hjemme. Det gjøres av helsepersonell, av pasienten selv eller andre omsorgspersoner (1,3–8)

Årsakene til at orale faste legemiddelformer blir manipulert er flere, men ofte skyldes det at pasienten har vansker med å svelge doseringsformen hel. Vanskene kan for eksempel komme av ulike sykdomsprosesser eller være en følge av naturlig funksjonstap ved alderdom. Svelging av hele tabletter eller kapsler er også ofte vanskelig for barn (7). Andre årsaker til manipulering av OFDF som kan nevnes er behov for enteral administrering gjennom sonde, at det ikke finnes markedsført preparat med ønsket legemiddelstyrke, eller at det ikke finnes markedsført preparat i en formulering som er tilpasset pasientens individuelle behov, eksempelvis for små barn eller eldre med svelgevansker (1,4,5,9,10). Manipuleringen kan også være i forbindelse med rusmisbruk, for eksempel tygging av bestemte typer depottabletter med opioider er rapportert (11).

Legemiddelrelaterte feil kan oppstå som følge av at faste perorale legemiddelformer blir manipulert, og praksisen anses derfor som problematisk i mange tilfeller. Fordi manipulering av OFDS kan endre hastigheten og omfanget av virkestofffrisettingen, kan manipulering føre

til endret effekt av legemidlet. Risikoen er størst for OFDS med modifisert virkestoffrisetting, men manipulering av OFDF med umiddelbar virkestoffrisetting anses heller ikke som fullstendig uproblematisk (1,9,10).

Deling av doseringsformen er eksempelvis vanlig for å oppnå bestemte legemiddeldoser. Tidligere studier har for eksempel funnet at dosevariasjoner kan forekomme ved deling av tableter (10,12). Hvorvidt disse avvikene er av klinisk betydning avhenger av en rekke faktorer, som terapeutiske område til virkestoffet (smalt vs. bredt) og pasientfaktorer (helsetilstand, alder, polyfarmasi) (8,12).

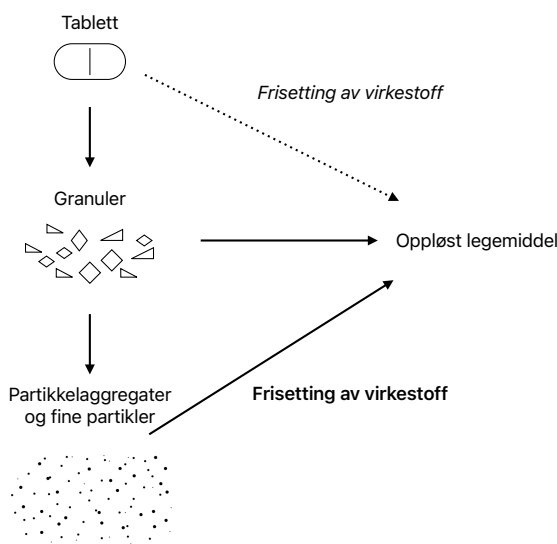
Manipulering av OFDF med modifisert frisetting frarådes med mindre annet er oppgitt i preparatomtalen for produktet, fordi det gir økt risiko for uønskede legemiddeleffekter. Avhengig av hvilket formuleringsdesign (f.eks. depotformulering eller enteroformulering), kan det medføre fare for overdosering, manglende effekt og terapivikt, eller skader på mageslimhinnen (1,9,10,13). Studier viser at også OFDF som ikke skal manipuleres blir manipulert, og at manipulering som medfører en risiko for pasienten forekommer (3,5–7,10).

Selv om det finnes en del litteratur som beskriver at manipulering av orale faste legemiddelformer med modifisert frisetting både forekommer og kan være negativt for pasienten, finnes det relativt lite kvantitative data på hvilke effekter knusing eller deling av OFDF med modifisert frisetting har, verken *in vitro* eller *in vivo*. Å undersøke hvordan frissettingshastigheten av legemidlet påvirkes *in vivo*, eksempelvis ved knusing av depottabletter, gjennom studier som innebærer dyremodeller eller mennesker er krevende. For å utføre slike studier er det både et spørsmål om tilgjengelige ressurser og ikke minst etiske aspekter. Det er også mulig å designe *in vitro* frissettingstester som forsøker å simulere *in vivo* gastrointestinale forhold. Dette omtales også som biorelevante frissettingstester (14). Til sammenligning er biorelevante frissettingstester atskillig billigere å utvikle, gjennomføre og uten tilsvarende etiske betenkeligheter som undersøkelse av frisetting *in vivo* (15,16). For at en biorelevant frissettingstest skal kunne brukes til å predikere/simulere *in vivo* frissettingsprofil til legemiddel fra OFDF, er det viktig at frissettingstesten på tilstrekkelig vis simulerer alle de gastrointestinale faktorene som kan tenkes å påvirke frisettingen av legemidlet. Dette kan gjøres gjennom bruk av ulike typer kunstig mage -og tarmsaft som oppløsningsmedia, og bruk av apparater som er i stand til å skape en etterligning av doseringsformens passasje gjennom de ulike delene av gastrointestinaltrakten (forkortet; GIT) (17).

## 1.2 Oppløsningsprosessen, legemiddelfrigjøring og absorpsjon av legemidler fra faste orale doseringsformer

Etter administrering av OFDF må virkestoffet løses og tilgjengeliggjøres for absorpsjon før legemidlet kan tas opp i kroppen og nå virkestedet. I oppgaven er det valgt å bruke benevnelsen *frisetting* for prosessen der virkestoff løses og tilgjengeliggjøres fra doseringsformen.

Hvordan virkestoffet frisettes i GIT varierer mellom de ulike OFDF, for eksempel depottabletter versus konvensjonelle tabletter: For konvensjonelle OFDF frisettes virkestoffet raskt og umiddelbart gjennom henfall og en oppløsningsprosess av virkestoff (engelsk; dissolution) som vist i figur 1. For OFDF med modifisert virkestofffrisetting styres derimot tilgjengeliggjøringen av virkestoffet gjennom frisettingen fra doseringsformen (18,19) (se eksempel illustrert i figur 2).



Figur 1: Skjematisk illustrasjon over den umiddelbare frisettingen av virkestoff fra en konvensjonell tablett. (Tegning laget etter figur 17.1 (20))

Oppløsning kan defineres som den prosessen der to faser blandes og det dannes en ny homogen fase, det vil si løsningen (en homogen molekylær dispersjon). Blandbarheten avhenger av flere ulike faktorer, deriblant stoffenes iboende egenskaper, temperatur og trykk til systemet (21,22).

Matematiske modeller bidrar til å forklare hvordan ulike faktorer påvirker oppløsningshastigheten av et fast stoff i et løsemiddel. De enkleste modellene ser på oppløsningshastigheten (dissolution og dissolution rate ser ut til å brukes vekselvis i engelsk litteratur) som en diffusjonsbasert prosess. Når et fast stoff, for eksempel et legemiddel (virkestoff), blir oppløst i en væske (løsemiddel/oppløsningsmediet), interagerer løsemidlet med det eksponerte overflatearealet til legemidlet som skal løses. I kontakten mellom fast stoff og løsemidlet vil molekyler løsriveres fra stoffets overflate og det dannes et diffusjonslag som omslutter det faste stoffet. Videre vil molekylene fra det oppløste legemidlet diffundere ut til det omkringliggende løsemidlet og bli en del av selve løsningen. Prosessen fortsetter inntil løselighetsgrensen til det aktuelle legemidlet nåes (22). Mest kjent er kanskje Noyes og Whitneys ligning (23). Ifølge ligningen er det et proporsjonalt forhold mellom oppløsningshastigheten til stoffet og konsentrasjonsforskjellen av oppløst stoff mellom diffusjonslaget som omgir det faste stoffet og oppløsningsmediet. Modellen er senere blitt videreutviklet og gitt opphav til nyere forklaringsmodeller. Et eksempel på dette er den modifiserte Nernst-Brunner-ligningen (se ligning 1) (22,24,25).

$$\frac{dm}{dt} = \frac{DA(t)}{L}(C_s - C_b) = k_c A(t)(C_s - C_b)$$

(Ligning 1)

Hvor  $dm/dt$  er den totale massen av oppløst stoff som dannes per tidsenhet,  $A$  er tilgjengelig overflateareal til uoppløst stoff for oppløsningsmedia ved tidspunkt  $t$ ,  $D$  er diffusjonskoeffisienten til oppløst stoff i oppløsningsmediet og  $L$  er tykkelsen på diffusjonslaget. Den modifiserte Nernst-Brunner-ligningen viser et proporsjonalt forhold mellom massen av oppløst stoff som til enhver tid fjernes ved diffusjon og størrelsen på overflatearealet til stoffet som er i ferd med å bli løst. Da er  $D/L = k_c$  hvor  $K_c$  er koeffisient for masseoverføring (22).

Ettersom disse modellene gir en mer generell beskrivelse av oppløsningshastigheten, er de også gjenstand for en viss kritikk. Men selv om flere svakheter kan påpekes og drøftes, anses de å være tilstrekkelige for de fleste bruksområdene som undersøker oppløsningshastighet til legemidler (22). Disse modellene blir ikke utdypet nærmere i oppgaven.

Absorpsjon av legemidler fra tynntarmen og/eller magesekken foregår oftest i form av *passiv diffusjon*. Drivkraften for diffusjonsprosessen er forskjellen i legemiddelkonsentrasjon på hver side av GI-membraner. Derfor må virkestoffet/legemidlet være løst i gastrointestinalvæsken (GI-væsken) for å bli tilgjengelig for absorpsjonen. Oppløselighet og permeabilitet for biologiske membraner kan derfor i denne sammenhengen ses på som de viktigste prosessene i opptak av legemidler. På samme måte som forskjellige legemidler kan ha ulik grad av løselighet, har forskjellige legemidler ulik evne til å passere biologiske membraner. Det biofarmasøytiske klassifiseringssystemet (BCS) kategoriserer legemidler i henhold til løselighet (høy eller lav) og permeabilitet (høy eller lav). Den treigeste av disse prosessene blir det hastighetsbestemmende trinnet for absorpsjonsprosessen som helhet (18,24,26). For OFDF med modifisert virkestoffrisetting, der legemidlet både har høy løselighet og høy permeabilitet (BCS-klasse 1), vil absorpsjonsprofilen av legemidlet typisk være bestemt av frisettingsraten av legemiddel fra doseringsenheten (17).

### 1.3 Depottabletter og hensikt

Depottabletter har frisettingsegenskaper som ikke oppnås med tilsvarende konvensjonelle tabletter. Frisettingen av virkestoff fra depottabletter er modifisert på en slik måte at virkestoffet frigjøres langsomt, kontinuerlig og kontrollert over en lengre tidsperiode. En slik uniform frisettingsrate gjør det lettere å opprettholde en relativt jevn plasmakonsentrasjon innenfor et terapeutisk konsentrasjonsområde over lengre tid og færre daglige doseringer sammenlignet med konvensjonelle tabletter. Det gir enklere behandlingsregimer for pasienter, og er assosiert med økt behandlingsetterlevelse. Den jevne frisettingsraten fra depottabletten forebygger også høye topper og lave daler i plasmakonsentrasjonen som ofte er tilfellet for flerdoseringsregimer med konvensjonelle tabletter. Færre fluktuasjoner mellom høyeste og laveste plasmakonsentrasjon av legemidlet reduserer risikoen for bivirkninger og toksisitet eller perioder med suboptimal effekt av legemidlet. Slik kan depottabletter (og andre depotformuleringer) for noen legemidler på flere måter bidra til bedre effekt av legemiddelet og samtidig gjøre legemiddelbehandlingen tryggere når det administreres riktig (17,27,28)

### 1.4 Oppbygging og typer depottabletter

Den kontrollerte frisettingsraten av virkestoff fra depottabletter kan oppnås ved bruk av spesielle hjelpestoffer og/eller prosedyrer i fremstillingen (29). Det finnes ulike prinsipper for å kontrollere frigjøringshastigheten av virkestoff fra OFDF. Prinsippene kan for eksempel

basere seg på diffusjon, oppløsningshastighet, erosjon, osmotisk trykk eller ionebytte. For eksempel kan frisettingshastigheten av virkestoff i et diffusjonskontrollert system bremses opp ved hjelp av ikke-vannløselige diffusjonsbarrierer som hydrofobe matrikssystemer eller membrankontrollerte systemer. Et eksempel der oppløsningshastigheten kontrollerer frisettingshastigheten er bruk av polymer-membraner eller matrikssystemer som langsomt oppløses og gradvis eksponerer virkestoffet for oppløsningsmedia (30).

Det finnes også flere typer depottabletter. Overordnet kan disse inndeles etter om doseringsformen som én enhet sørger for langsom frigjøring av virkestoffet (single-unit-dosage form, SUDF) eller om det er flere enheter som hver for seg har langsom frigjøring av virkestoffet (multiple-unit-dosage form MUDF, også kalt multipartikulære systemer).

Fordelene med MUDF over SUDF skal blant annet være redusert risiko for virkestoffdumping (dose dumping), og lavere intra -og interindividuelle variasjoner når det gjelder frisetting av virkestoff og følgelig derfor assosiert med eksempelvis bedre og mindre variasjoner i klinisk effekt og redusert hyppighet av bivirkninger (sammenlignet med SUDF) (17,31). MUDF gjør det også mulig å oppnå en kompleks frigjøringskinetikk i én doseringsenhet slik som pulsativ frigjøring. Dette kan praktisk gjennomføres ved å kombinere ulike enheter i MUDF, eksempelvis pellets, med forskjellig frisettingsrate av virkestoff. MUPS er i økende grad i søkelyset når det gjelder utvikling av formuleringer som er tilpasset spesielle pasientgrupper, for eksempel barn eller eldre som ofte har svelge vansker i forbindelse med administrering av tabletter eller kapsler (17,31–33).

## 1.5 Theo-Dur

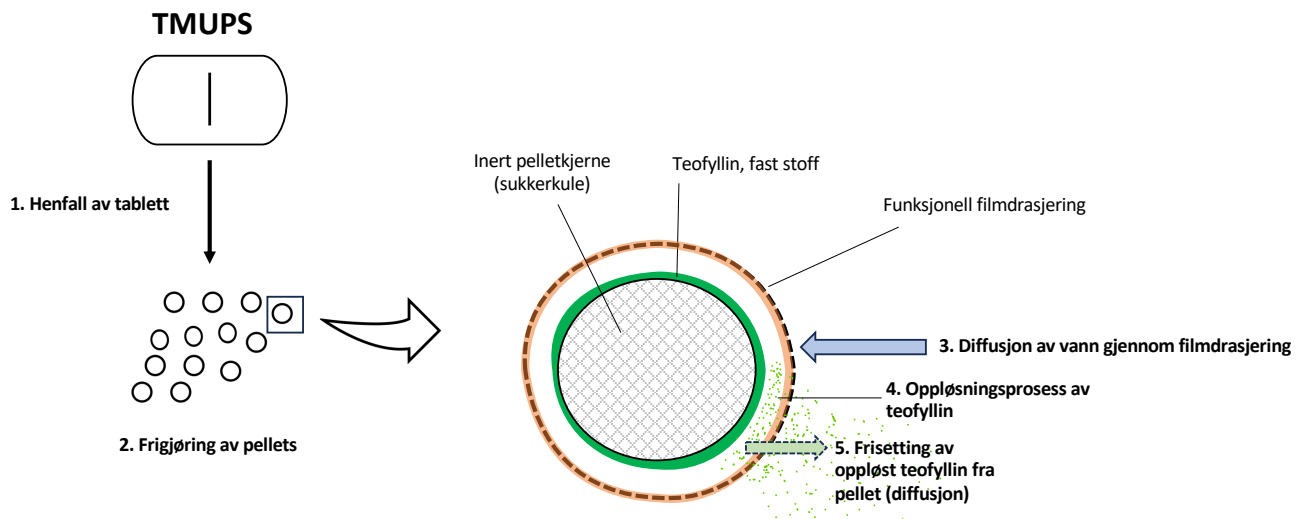
Theo-Dur® depottabletter (KARO Pharma AB) med 300 mg teofyllin er benyttet som modell-legemiddel i dette masterprosjektet. Et sammendrag av teofyllins fysikalsk-kjemiske egenskaper og hjelpestoffer er gitt i appendiks 2. Dette legemidlet er opprinnelig brukt i behandling av astma og KOLS og blir vanligvis administrert med 12 timers mellomrom. Ifølge felleskatalogen skal Theo-Dur® depottabletter ikke tygges eller knuses, men svelges hele. Depottablettene kan også deles i to uten ødeleggelse av depoteffekten, så fremt at hver halvdel svelges hel (34,35). I et forsøk på å finne mer informasjon om hvordan Theo-Dur® depottabletter er formulert; sammensetning av hjelpestoffer og frisettingsmekanisme, ble det søkt etter tilgjengelig informasjon fra preparatomtaler (35,36), publiserte studier (31,37,38) og patentspesifikasjoner (39–41). Fra dette er det sannsynlig at depottablettene av Theo-Dur® i prosjektet er formulert som MUDF. Det kan se ut til at enhetene MUDF består av pellets med

virkestoff (multi-unit pellet system, MUPS). Til slutt har pellets og hjelpestoffer blitt komprimert til tabletter (tablets of MUPS; TMUPS), der hver tablett inneholder sin doserte mengde av teofyllin. TMUPS kan ofte formuleres slik at deling av depottabletten ikke forringer depotteffekten (31), som også er tilfellet for Theo-Dur® depottabletter, ifølge preparatomtalen (34).

Nøyaktig hvilke prinsipper som er benyttet for å oppnå langsom frigjøring av teofyllin fra disse depottablettene har ikke vært mulig å fastslå med sikkerhet. Men en forenklet antatt oppbygging av Theo-Dur® depottablett og mulig frigjøringsmekanisme kan foreslås basert på hjelpestoffene som oppgis i preparatomtaler (35,36), noen publiserte studier (31,37,38), enkelte patenter (39–41) og annen litteratur som omhandler formuleringsteknologi og frisettingsmekanismer (30,32,33,42–44).

Dette er at teofyllin trolig er fordelt på overflaten til flere sukkerkuler (kjerner, omtales heretter som pellet). Hver pellet, eller en andel av pelletene er omgitt av en funksjonell filmdrasjering med en lite vannoppløselig polymer. Filmdrasjeringen kontrollerer diffusjon av vann inn til pellet med teofyllin, og diffusjon av oppløst teofyllin ut av pelleten. Hver drasjerte pellet fungerer da som et diffusjonskontrollert (membrankontrollert) reservoar system. Det er usikkert om no MUDS gjør det mulig å kombinere flere enheter (i dette tilfellet pellets) med ulik frisettingsprofil i samme doseringsenhet, hvorvidt dette gjelder Theo-Dur® depottabletter i prosjektet, kan ikke utelukkes (32,42). Før komprimering til tabletter blir pelletene sannsynligvis omgitt av hjelpestoffer som virker som dempere. Hensikten er å unngå at filmdrasjeringen skades når pellet og tablett-hjelpestoffer blandes og komprimeres til tabletter. Glyserol monostearat blir nevnt av Chen et al som et eksempel på dette (31).





**Figur 2:** Illustrasjon av foreslått oppbygging og frisettingsmekanisme av teofyllin fra pellet (TMUPS). Tegning er inspirert fra figur 24 (30), figur 1a (33) og figur 4 (31)

## 1.6 Frisettingstester av faste orale faste legemiddelformer

I dag er *in vitro* frisettingstester (engelsk; dissolution test, heretter forkortet FST) den mest brukte metoden for å undersøke frisettings hastighet og frisettingsomfang av virkestoff fra OFDF. FST har en sentral rolle både i produktutvikling og i kvalitetstesting av utviklede og markedsførte legemiddelprodukter. (14,45,46). Avhengig av metodedesignet til FST, kan resultatene eksempelvis brukes til å diskriminere mellom gode og dårlige batcher av et produkt eller predikere en forventet *in vivo* frisetting legemiddelet i en pasient (14,45–47). Selv om prinsippet bak FST er enkelt, kompliseres ofte FST av faste orale legemiddelformer av at svært mange faktorer kan innvirke på frisettings hastigheten og resultatene av FST, enten direkte eller indirekte. Dette er faktorer som kan knyttes til fysikalsk-kjemiske egenskaper til virkestoffer og hjelpestoffer, faktorer knyttet til produksjonsprosessen av produktet, legemiddelformuleringen, valg av metode og apparatur for FST, materialer, prøveopparbeidelse og analyse av prøvene (42,45,48–53). Eksempler på noen av parameterne som kan påvirke frisettings hastigheten er gitt i tabell 1.

**Tabell 1:** Eksempler på parametere som kan påvirke frisettings karakteristikkene/frisettings hastigheten til ved FST av OFDF (45,52,54,55).

Fysikalsk-kjemiske egenskaper til virkestoffet	Produksjon og Formulering	Forsøksbetingelser og apparatur
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Pka-verdi</li> <li>- Løselighet</li> <li>- Partikkelstørrelse</li> <li>- Stabilitet i løsning</li> <li>- Polymorfisme og krystallstruktur</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Type formulering og frisettingsmekanisme av virkestoff</li> <li>- Trykk v/ kompresjon (f.eks. under tabletering)</li> <li>- Interaksjoner mellom Virkestoff-hjelpestoff</li> <li>- Lagringsbetingelser</li> <li>- Typer hjelpestoffer (kan hemme eller fremme FSH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Type apparat</li> <li>- Volum oppløsningsmedia</li> <li>- Type oppløsningsmedia (pH, bufferkapasitet, viskositet, surfaktanter og lipider)</li> <li>- Luft i oppløsningsmedia</li> <li>- Plassering av doseringsform i apparat</li> <li>- Temperatur</li> <li>- Hydrodynamiske forhold (f.eks. strømningsmønster til oppløsningsmedia)</li> <li>- Filtrering og type filter</li> <li>- Vibreringer i eller ved apparat</li> </ul>

### 1.6.1 Metoder for biorelevante *in vitro* frisettingstester

Det finnes ulike metoder og apparater for FST, og valget av disse bestemmes i stor grad av formålet med den aktuelle FST. Uavhengig av hvilken metode og apparat som brukes, bør FST foregå under godt definerte betingelser, slik at resultatene for eksempel kan brukes som sammenligningsgrunnlag for gjentatte eller andre FST (46). Farmakopeene beskriver ulike apparater og metoder for FST, samt kvalitetskravene som gjelder for ulike typer OFDF. Disse er hovedsakelig utviklet for kvalitetskontroll av ferdige legemiddelprodukter (17,56). Når formålet med en FST er å simulere mer reelle GI betingelser er metodene for FST i farmakopéer, som European Pharmacopoeia (forkortet Ph.Eur) i mindre grad anvendbare. Disse metodene for FST greier ikke på et tilstrekkelig vis å gjenspeile mange av faktorene som kan påvirke *in vivo* frisettingen i GIT. For at en biorelevant FST skal kunne gi prediktive data for *in vivo* frisetting, er det viktig at testen inkluderer simulering av alle de GI-faktorene som kan tenkes på påvirke legemiddelfrisettingen til den gjeldende OFDF (17). Det kan også være store forskjeller mellom OFDF preparater når det gjelder hvilke faktorer som påvirker frisettingshastigheten av virkestoffet. I hvor stor grad FST må etterligne GI forhold for å kunne være av *in vivo* prediktiv verdi, avhenger hovedsakelig av egenskapene til virkestoffet, og i noen tilfeller også av egenskapene til formuleringen (15,57). Dette gjør at utvikling av

biorelevante FST kan bli svært omfattende og krevende med hensyn til de mange vurderingene og avgjørelser som må tas i forbindelse med metodeutviklingen (57,58).

Det er beskrevet fire standardiserte apparater for FST til tabletter og kapsler i den europeiske og amerikanske farmakopé (46,59). Disse er kortfattet presentert i tabell 1, se appendiks 1. Apparat 1 og apparat 2 har den fordel at de er enkle, robuste og lette å standardisere. En mulig ulempe er derimot begrensningen i volum oppløsningsmedia som kan gjøre det vanskelig å oppnå «Sink conditions<sup>1</sup>». Det kan da bli problematisk å gjennomføre FST av OFDF med lite løselige virkestoffer. Det er også krevende å skifte ut oppløsningsmedia underveis i FST med apparat 1 og apparat 2. En av fordelene med apparat 3 og apparat 4 er derimot at oppløsningsmedia enkelt og raskt kan skiftes underveis i testen. Da er det enklere å etterligne skiftet mellom de ulike fysiologiske forholdene i GIT med apparat 3 og apparat 4 (56,61). Det kan være særlig fordelaktig for FST av faste orale preparater med modifisert frisetting, som depottabletter, fordi testen da kan gi informasjon om hvorvidt miljøendringene mellom de ulike GI-segmentene påvirker legemidlets frisettingsprofil. Ulemper som nevnes for apparat 3 er vansker med å opprettholde «sink conditions» over lengre tid av gangen (62). Det må også tas høyde for at svinn kan forekomme under FST av formuleringer som pulver i apparat 3. Dette skjer dersom pulverpartiklene unnslipper gjennom et åpent gitter i bunnen av sylindere der formuleringen er plassert (58). Dette problemet unngås ved bruk av apparat 4, samt at her kan FST også utføres med “ubegrensede” mengder oppløsningsmedia. FST kan da i teorien gjøres under sink conditions (63).

### 1.6.2 Apparat 4

Apparat 4 anses som hensiktsmessig for FST i flere sammenhenger.

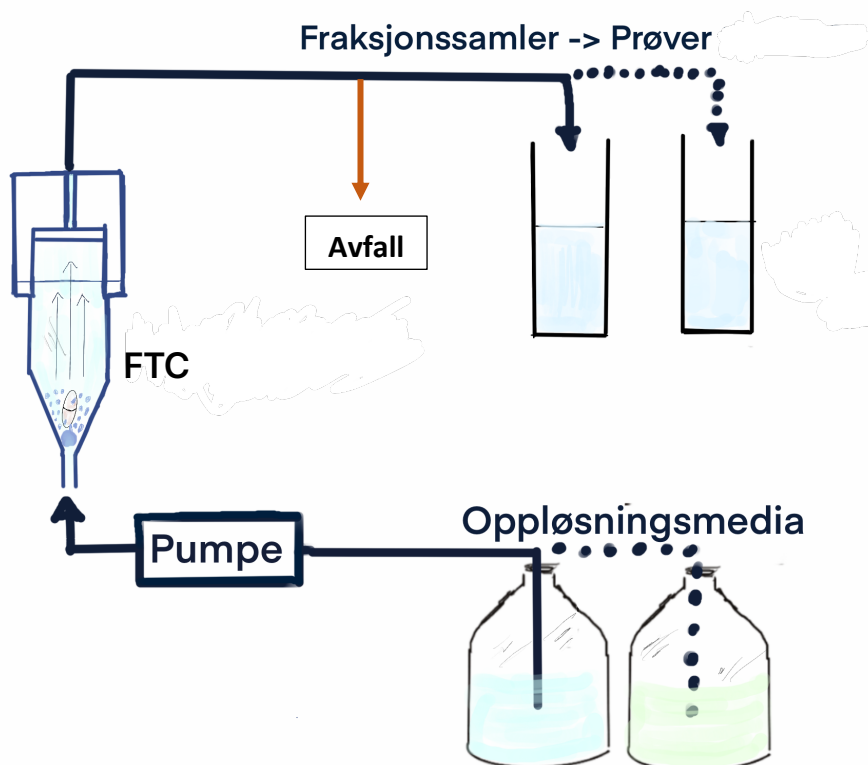
I åpen konfigurasjon kan FST av OFDF i teorien utføres under sink conditions. I tillegg til de fordelene beskrevet i forrige kapittel, er sink conditions gunstig for å kunne simulere at virkestoffet stadig fjernes fra oppløsningen som følge av en absorpsjonsprosess. FST i lukket konfigurasjon (oppløsningsmedia sirkulerer og gjenbrukes, som et lukket system) kan være fordelaktig i en FST for å holde konsentrasjonen i prøvene over en kvantifiseringsgrense.

---

<sup>1</sup> «Sink conditions» oppnås når konsentrasjonen i oppløsningsmediet ikke rekker å overstige verdier mer enn 10-20% av metningskonsentrasjonen (Cs) (60).

Bytte av oppløsningsmedia kan gjøres flere ganger underveis i FST med apparat 4, eksempelvis et skifte mellom kunstig magesaft til kunstig tynntarmssaft (14,61,62).

Legemiddelformen som skal testes plasseres i en celle (Flow-Through Cell, forkortet FTC) ved FST i apparat 4 (se figur 3). Fra bunnen av FTC tilføres det kontinuerlig et oppløsningsmedia med en bestemt hastighet. En pumpe tilkoblet et reservoar med oppløsningsmedia sørger for denne kontinuerlige gjennomstrømmingen av oppløsningsmedia i FTC. Oppløsningsmedia fraktes videre ut gjennom en utførselsgang i toppen av FTC. Her er det også plassert et filter, som er ment å holde tilbake uoppløst materiale. Prøver fra den utgående løsningen (oppløsningsmedia med oppløst virkestoff) samles gjennom flere tidsintervaller. Dette skjer automatisk ved hjelp av en fraksjonssamler (Fraction collector, forkortet FRC). Mengde virkestoff i hver prøve blir så kvantifisert med en egnet analysemetode. FST foregår under konstant temperatur ved at et temperaturregulert vannbad omgir FTC og slangene som tilfører oppløsningsmedia. Flere ulike oppsett og typer av FTC er også mulig (17,61,64).



**Figur 3:** Viser apparat 4 i konfigurasjon (Tegning tilpasset fra (65))

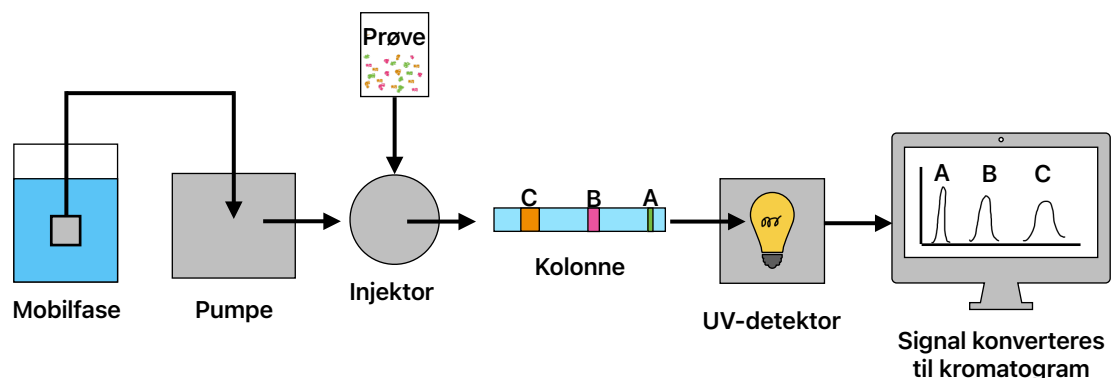
Noen ulemper som er forbundet med FST i apparat 4 er blant annet et stort forbruk av oppløsningsmedia ved FST med åpen konfigurasjon. Blokkering av filter i utførselsgangen av FTC er rapportert som problematisk. Dette kan forstyrre apparatet fra å opprettholde gjennomstrømningshastigheten av oppløsningsmedia. Det kan også forårsake trykkproblemer i FTC. Problemer med blokkering beskrives å være særlig relevant ved FST av pulver i apparat 4 (61,64,66,67). En annen utfordringen som gjelder for apparat 4 så vel som for apparatene nevnt tidligere i kapitlet, er at ulike OFDF nødvendigvis ikke påvirkes i samme grad av de samme faktorene. For eksempel kan frissetingsraten av en OFDF påvirkes av formuleringens plassering i FTC, og en annen ikke (54,55,61).

## 1.7 Høypresisjonsvæskerkromatografi (HPLC)

Høypresisjonsvæskerkromatografi (high performance liquid chromatography; HPLC) er en instrumentell væskerkromatografimetode, som brukes til å separere en eller flere forbindelser i en løsning fra hverandre. Formålet med separasjonen kan for eksempel være å bestemme konsentrasjonen av en forbindelse i en prøve. I HPLC-apparatet blir prøven injisert og fraktet sammen med en mobilfase gjennom en analysekolonne med høyt trykk (68).

### 1.7.1 HPLC med UV-deteksjon

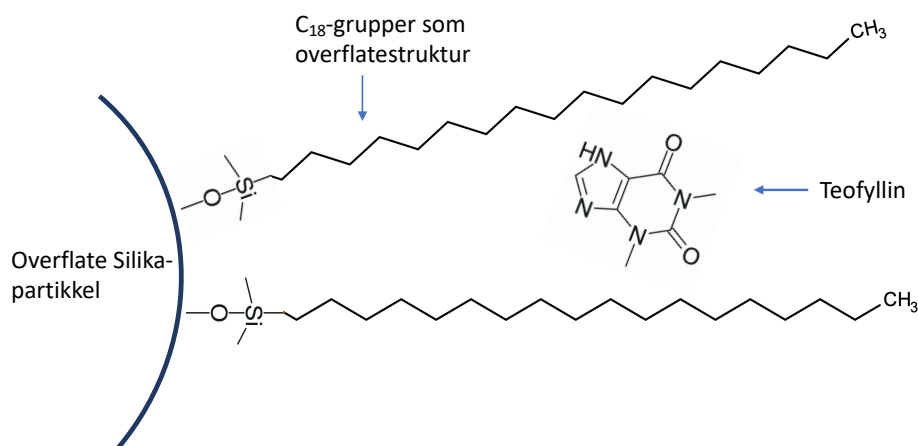
Forskjellige detektorer kan kobles til HPLC-apparatet for å påvise og bestemme konsentrasjon til en eller flere av forbindelsene som elueres ut av HPLC-kolonnen. HPLC koblet til detektor er et av de viktigste analyseverktøyene i farmasøytisk industri. Eksempler på ulike HPLC-detektorer er UV-detektor, massespektrometer (MS) og fluorescensdetektor og brytningsindeksdetektor (68,69). I dette prosjektet ble det brukt HPLC koblet sammen med en monokromatisk UV-detektor (illustrert i figur 4). Her går analytten videre fra HPLC-kolonnen til en detektorcelle som sender ut UV-lys med en bestemte bølgelengde. Lyset analytten absorberer når den passerer detektorcellen registreres og signalet presenteres som en topp i et kromatogram. Videre kan høyde eller arealet til toppen brukes for å bestemme konsentrasjon av forbindelsen i prøven, så lenge relasjonen mellom signalintensitet og konsentrasjon er proporsjonale. Denne proporsjonaliteten er konsentrasjonsavhengig (68) .



**Figur 4:** HPLC-UV-instrument illustrert som flytskjema. (Tegning laget etter figur 10.2 (70) og figur 11.1 (71) og tilpasset).

### 1.7.2 Omvendtfase HPLC med C18-kolonne og UV-deteksjon

Omvendtfase HPLC (reverse phase HPLC, ofte forkortet RP-HPLC) er en kromatografisk separasjonsteknikk, der analysekolonnen er pakket med en upolar stasjonærfase. Prøven injiseres i HPLC sammen med en mer polar mobilfasesammensetning. Elueringshastigheten gjennom analysekolonnen vil her være større for prøvekomponentene med hydrofile egenskaper, mens mer lipofile prøvekomponenter i større grad bremses i kolonnen som følge av hydrofobe interaksjoner med stasjonærfasen. Ved RP-HPLC består stasjonærfasen vanligvis av modifiserte silikapartikler med lange hydrokarbonkjeder festet til overflaten. Ofte benyttes C18 alkylkjeder som stasjonærfase i disse kolonnene (såkalt C18-kolonner), se figur 5 (68,72).



**Figur 5:** Forenklet illustrasjon av silikapartikkel der overflaten er modifisert med lange C<sub>18</sub>-alkylkjeder som stasjonærfase i HPLC kolonne ved reversfase kromatografi. (Tegning er laget etter figur 11.4 (73) og tilpasset).

Det finnes mange typer C18-kolonner. Disse varierer med hensyn til blant annet lengde og diameter til kolonnen, tilgjengelig overflateareal og kjemisk stabilitet til stasjonærfasen, størrelse og form på partiklene kolonnen er pakket med og variert grad av etter-silanisering (ende-kapping). Ulike typer C18 materialer kan gi stor forskjell i retensjon og kolonneeffektivitet, noe som har betydning for elueringstiden til forbindelsen, høyde, bredde og symmetrien til toppen i kromatogrammet. Valg av kolonne avhenger derfor i stor grad av dens tiltenkte bruksområde. For eksempel anses kolonner med mindre partikkelstørrelse på stasjonærfasen å ha bedre separasjonsevne og lavere forbruk av mobilfase. Dette kan for eksempel være en fordel når det er mange småmolekylære forbindelser i prøven som skal separeres, detekteres og kvantifiseres. Til gjengjeld er disse kolonnene mer sårbare for å gå tett fordi partikler fra blant annet prøvematerialet eller små fragmenter fra slitte pakninger i HPLC blir sittende fast i kolonnen (68,72,74,75).

Mobilfasene som brukes ved RP-HPLC er vanligvis en blanding av vann og en eller flere organiske løsemidler med blandbarhet i vann. Metanol og vann er en mye brukt mobilfasesammensetning, og er ofte førstevalget av organisk løsemiddel. Valg og regulering av styrken på mobilfasesammensetningen er av stor betydning for utvikling og optimalisering av en analysemetode med HPLC, for eksempel med hensyn til analysetid og formen på toppene i kromatogrammet (72,76). Også små variasjoner i analyttens molekylstruktur kan ha uønsket effekt på kromatogrammene. Analytter med ioniserbare grupper påvirkes av pH i mobilfasen, noe som kan gi såkalte sekundære likevektseffekter for retensjonen av analytten (77). Dette reguleres gjennom å kontrollere pH til mobilfasen og bruk av bufferløsninger i mobilfasen. En generell anbefaling er å bruke mobilfaser som enten er to pH-enheter over eller under analyttens pK<sub>a</sub>-verdi. Andre viktige vurderinger i forhold til valg av mobilfase er dens evne til absorpsjon av UV-lys, transparens, stabilitet, viskositet og kompatibilitet og løselighet av prøve med mobilfasen (75,76). Sammensetningen til mobilfasen kan være konstant under hele analysen (isokratisk eluering) eller endres underveis i analysen (gradient eluering). Isokratisk eluering er enklere i bruk enn gradient eluering. Samtidig kan gradient eluering være nødvendig ved for eksempel

analyse av prøver med en kompleks sammensetning, slik som forbindelser med svært ulik polaritet i HPLC (75,76,78).

## 1.8 Hensikten med prosjektet og problemstilling

Hovedmålet med denne forskningen er på sikt å utvikle metoder for *in vitro* FST i apparat 4 under simulerte gastrointestinale betingelser for manipulerede OFDF med modifisert frisetting. Hensikten er å kunne studere konsekvensen slik manipulering kan ha for frisettingsprofilen til virkestoffet. Masterprosjektet var den innledende og første delen av dette forskningsprosjektet. Hovedmålsettingen til masterprosjektet var å utvikle en metode for FST i apparat 4 under simulerte gastrointestinale betingelser, med hele, delte og knuste Theo-Dur® depottabletter som modellpreparat. Metodeutviklingen hadde følgende mål og delmål:

- FST i apparat 4 under simulerte gastrointestinale betingelser, inkludert bruk av biorelevant oppløsningsmedia, med følgende delmål:
  - Innledende utvikling av studiedesign og fastsette aktuelle forsøksbetingelser (f.eks. valg av oppløsningsmedia, gjennomstrømningshastighet på oppløsningsmedia, temperatur, varighet og tidsintervaller for prøvetaking).
  - Kartlegging og vurderinger av relevante fysikalsk-kjemiske egenskaper til produktet/legemidlet.
- Utvikle en egnet metode for HPLC-analyse for konsentrasjonsbestemmelse av virkestoff i prøvene fra FST.
  - Identifisere egnede kromatografiske betingelser for HPLC-analyse og deteksjon.
  - Kalibrering av HPLC ved bruk av eksternstandard som metode.
  - Anvende HPLC-metode for kvantifisering av teofyllin i prøver fra FST.
- Validere og bruke utviklet metoder til å undersøke *in vitro* frisetting av teofyllin fra manipulerede og intakte Theo-Dur® depottabletter (hovedsakelig knuste, delte og hele depottabletter).



## 2. Materialer og metode

Supplerende informasjon om fysikalsk-kjemiske egenskaper til teofyllin er gitt i appendiks 2.

### 2.1 Løsninger fra pulver av teofyllin

Analysevekt brukt til innveiing av materiale var Sartorius Extend (ED224S Sartorius AG) hvis ikke annet er spesifisert i forsøket.

Til fortynning av teofyllinløsninger ble det brukt fullpipetter (10 mL, 20 mL og 25 mL, VWR®) og finpipetter (5–50 µL, 100–1000 µL og 0,5–5 mL, Thermo scientific®) til uttak av kjent prøvevolum. Renset vann (Nemko Norlab, Namdal; heretter N.Nlab og vannrensesystem smart2pure pro Thermo Scientific). Målekolber (10 mL, 25 mL, 50 mL, 100 og 1000 mL, Duran®) ble brukt til å fortynne prøvene til ønsket volum.

#### 2.1.1 Stamløsning av teofyllin fra teofyllin monohydrat

Teofyllin monohydrat (donert fra UiT, 2014) (tilsvarende 0,0200 g teofyllin) ble løst i renset vann (N.Nlab) og fortynnet til 100 mL, tilsvarende [200 mg/L] konsentrasjon.

#### 2.1.2 Stamløsning av teofyllin fra teofyllin anhydrat

Teofyllin anhydrat (0,0200 g – 0,0202 g tilsvarende  $\geq 99\%$  teofyllin, Sigma-Aldrich) ble løst i renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og fortynnet til 100 mL tilsvarende [200 – 202 mg/L] konsentrasjon. Løsningen ble sonikert i 10 minutter (VWR™, ultrasonic cleaner, model USC500T).

#### 2.1.3 Andre løsninger av teofyllin fra teofyllin anhydrat

En kjent mengde teofyllin anhydrat ble løst i renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og fortynnet til ønsket volum. Løsningen ble sonikert i 10 minutter. Disse løsningene ble filtrert gjennom sprøytefilter (CA-membran, 25 mm diameter, 0,22 µm porestørrelse, VWR®) med mindre annet er spesifisert i metodebeskrivelsen til forsøket-vurder om dette forsøket skal være med eller ikke.

#### 2.1.4 Tillaging av standardløsninger fra stamløsning teofyllin monohydrat

Fra stamløsning av teofyllin monohydrat (konsentrasjon tilsvarende 200 mg/L teofyllin, laget som oppgitt i kapittel 2.1.1) ble det laget fortynninger til standardløsninger med

teofyllinkonsentrasjon 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L. Fullpipetter (10 mL og 25 mL, VWR®) ble brukt til uttak av løsninger til fortynning. Renset vann (N.Nlab) og målekolber (50 mL og 100 mL, Duran®) ble brukt til å fortynne til ønsket volum. Fra hver standardløsning ble laget ble ca 1 mL overført til HPLC-prøvebeholder (og merket). Skrulokk med gummiseptum (9mm rub. Natur/TEF, VWR®) ble satt på og prøvebeholderne ble plassert i HPLC (1260 Infinity, Agilent Technologies). Med mindre annet er spesifisert i metodebeskrivelsen ble ikke løsninger av teofyllin monohydrat (2014, Tromsø) filtrert, men ble direkte overført til HPLC-prøvebeholder (1,5 mL, GmbH & Co. KG), påsatt skrutopp og videre plassert i HPLC.

### 2.1.5 Tillaging av standardløsninger fra stamløsning teofyllin anhydrat

Fra stamløsning av teofyllin anhydrat (konsentrasjon 200-202 mg/L teofyllin, laget som oppgitt i kapittel 2.1.2) ble det laget fortynninger til standardløsninger med ulike konsentrasjoner. Mer detaljert beskrivelse av konsentrasjonsområdene gis i metodebeskrivelsen til de aktuelle forsøkene. Finpipetter (5–50 µL, 100–1000 µL og 0,5–5 mL, Thermo scientific ®) ble brukt til uttak av løsninger til fortynning. Renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og målekolber (10 mL og 25 mL, Duran®) ble brukt til å fortynne til ønsket volum. Løsninger av teofyllin anhydrat ble filtrert gjennom sprøytefilter med mindre annet er spesifisert i metodebeskrivelsen til forsøket. Fra hver standardløsning laget ble 5 mL trukket opp i 5-mL målesprøye og filtrert gjennom sprøytefilter (CA-membran, 25 mm diameter, 0,22 µm porestørrelse, VWR®). De 4 første mL ble forkastet, siste 1 mL ble overført til HPLC-prøvebeholder og plassert i HPLC. Samme sprøytefilter ble brukt til å filtrere alle prøvene fra standardseriene før HPLC-analyse.

### 2.1.6 Løsning av teofyllin fra Theo-Dur® 300 mg depottabletter

Løsningene ble laget fra Theo-Dur® 300 mg depottabletter (KARO Pharma AB, LOT: 2105001A, utl.dato 04/2024). Vekten til hver av depottablettene ble registrert før knusing.

#### *Løsning 1*

Et stykk Theo-Dur® 300 mg depottablett (BioPhausia, LOT: 63326C, utl.dato: 11/2020) ble knust/revet til homogen pulverblanding i porselensmorter. Pulverblandingen ble overført til 1000-mL målekolbe, forsøkt løst i rensert vann (N.Nlab) og fortynnet til 1000 mL. Løsningen

ble filtrert gjennom glassintertrakt. 100 mL av filtratet ble filtrert gjennom sprøytefilter (GHP-membran 25 mm diameter, 0,45 µm porestørrelse, Acrodisc®) og fortynnet til 1000 mL med renset vann (N.Nlab).

### *Løsning 2*

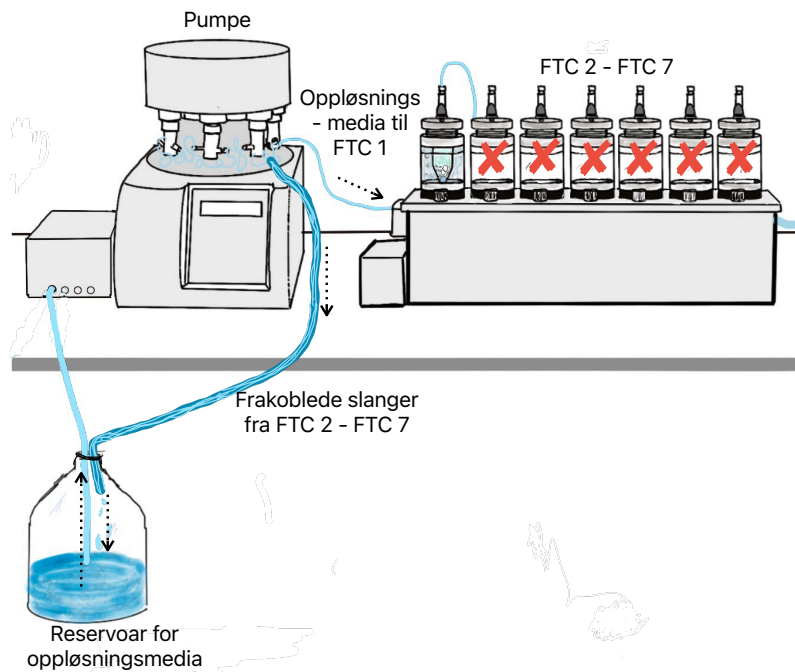
I porselensmorter ble 3 stykk Theo-Dur® 300 mg depottabletter (KARO Pharma) revet/knust til en homogen pulverblanding. Fra pulverblandingen ble det tatt ut delmengder (0,0500 g) tilsvarende antallet av løsninger som skulle fremstilles. Hver av disse ble løst i renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og fortynnet til 100 mL. Løsning(e) ble sonikert i 10 minutter. En mengde fra hver løsning ble tatt ut og filtrert gjennom sprøytefilter (CA-membran, 25 mm diameter, 0,22 µm porestørrelse, VWR®). Et kjent volum av filtratet ble deretter fortynnet med faktor 20 med renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific).

### *Løsning 3*

Homogen pulverblanding (0,0500 g) fra 3 stykk knuste depottabletter (KARO Pharma) sammen med en kjent mengde teofyllin anhydrat (tilsvarende  $\geq 99\%$  teofyllin) ble løst i renset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og fortynnet til 100 mL. Løsningen ble deretter sonikert, filtrert gjennom sprøytefilter og videre fortynnet på samme måte som *Løsning 2* i dette kapitlet.

## 2.2 Frisettingstest (FST) av Theo-Dur® depottabletter i apparat og prosessparameterne

Alle FST fra Theo-Dur® depottabletter (videre omtalt som depottabletter) ble utført i apparat 4, gjennomstrømningscelle (USP4 DFZ II Stand-Alone Flow-Through System, inkl. automatisk prøveoppsamling, Erweka GmbH, Langen Tyskland) (59). Forsøkene ble utført med åpen konfigurasjon. Apparat 4 var ombygget av Daniel Zeiss slik at FST kunne utføres uten at alle apparatets 7 gjennomstrømningsceller (FTC) ble tilført oppløsningsmedia samtidig (se figur 6). I hvert forsøk ble 1 eller 3 FTC tilkoblet forsyning av oppløsningsmedia og benyttet til FST. Slangere som forsynte øvrige FTC var koblet fra. Disse slangene var anlagt slik at oppløsningsmedia til FTC som ikke var i bruk, sirkulerte tilbake til apparatets reservoar for oppløsningsmedia, og ble gjenbrukt.



**Figur 6:** Viser FST i ombygget apparat 4 med FTC 1 tilkoblet forsyning av oppløsningsmedia. Slangene som skal føre oppløsningsmedia gjennom FTC 2 - FTC 7 er koblet om slik at oppløsningsmedia føres tilbake til reservoaret.

Prosessparametere brukt ved FST i dette prosjektet tok utgangspunkt i beskrivelsene av FST i en studie utført av Reppas et al (62). Parameterne ble tilpasset de innstillingene som var tilgjengelig i programvaren (Disso.NET 3.0.2.0, Erweka) for apparat 4 i vårt prosjekt. Total varighet av hver FST i prosjektet var 360 minutter, fordelt på 18 tidsintervaller (20 minutter). En oppsummering prosessparametere for disse testene er vist i tabell 2.

Gjennomstrømningshastighet (engelsk; «flow-rate») til oppløsningsmedia (pumpe HKP 720, Erweka) ble satt til 8 ml/min for de to første tidsintervallene (simulerte forhold i fastende magesekk). Denne ble redusert til 4 ml/min (simulert overgang til tynntarm) i de gjenværende 16 tidsintervallene.

Prøvene fra FTC for hvert tidsintervall ble automatisk samlet via en fraksjonssamler (FRL-724, Erweka). Prøvevolumet var satt til 20 mL. Renset vann (fra vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) ble brukt som oppløsningsmedia (temperatur  $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ ) i alle eksperimentene (uten buffer).

**Tabell 2:** Oversikt over et utvalg av prosessparametere benyttet ved alle FST med Theo-Dur depottablett i apparat 4.

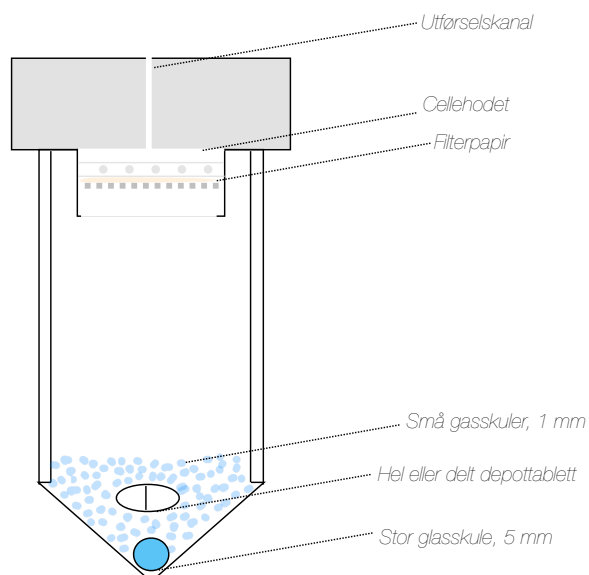
Antall	Varighet av intervall [min]	Flow-rate [ml/min]	Kummulativ varighet [min]	Simulert region av GIT (fastende)
2	20	8	40	Magesekk (fastende)
16	20	4	320	Tynntarm (fastende)

### 2.2.1 Oppsett av gjennomstrømningsceller (Flow-through cell; FTC)

#### Tablettcelle (22,6 mm diameter)

Følgende oppsett ble valgt for FST med tablettcelle (22,6 mm diameter):

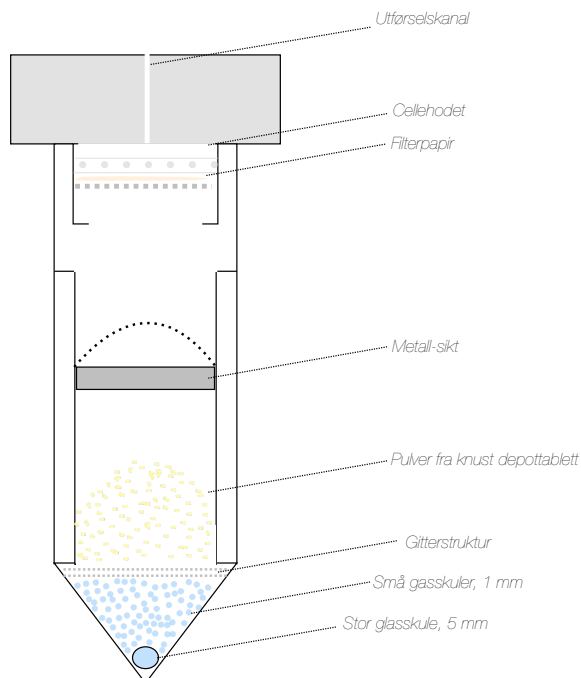
I tablettcellens bunn ble det plassert én glasskule (størrelse 5 mm), etterfulgt av 0,5 g av små glasskuler (1 mm-størrelse). Theo-Dur®-depottablett (hel, delt, forsiktig knust -eller fullstendig knust) ble overført, etterfulgt av 1,5 g små glasskuler (1 mm-størrelse).



**Figur 7:** Illustrasjon av FTC av typen tablettcelle (22,6 mm i diameter) til FST i apparat 4.

### *Granulat -og pulvercelle, originalt oppsett*

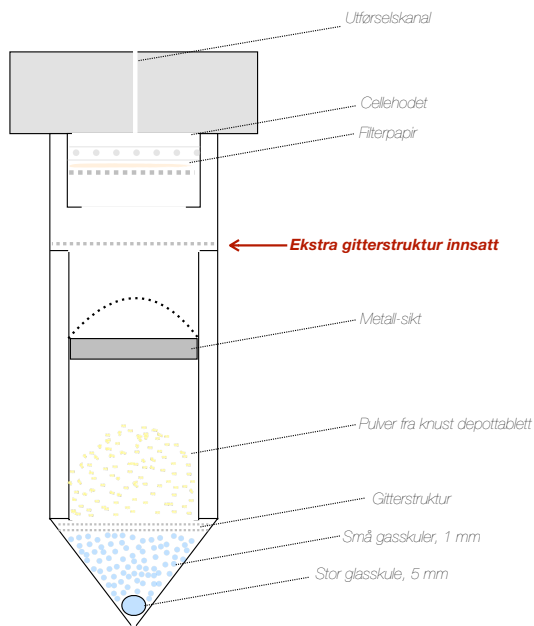
Denne cellen er laget for FST fra pulver -og granulater som legemiddelformulering. Det ble valgt samme oppsett som beskrevet i brukermanual (79) og er vist i figur 8.



**Figur 8:** Illustrasjon av FTC av type granulat-og pulvercelle (originalt oppsett) til FST i apparat 4.

### *Granulat -og pulvercelle, revidert oppsett*

Til forskjell fra originalt oppsatt granulat- og pulvercelle ble det i revidert oppsett plassert en ekstra gitterstruktur i rommet mellom konisk metallsikt og cellehodet. Øvrig oppsett av cellen var identisk med oppsettet til original granulat -og pulvercelle som beskrevet i forrige avsnitt.



**Figur 9:** Illustrasjon av FTC av type granulat-og pulvercelle (revidert oppsett) til FST i apparat 4.

### 2.2.2 Håndtering av depottabletter før frisettingstest i apparat 4

Det ble brukt Theo-Dur® 300 mg depottabletter (KARO Pharma AB) i disse forsøkene.

#### *Hele og delte depottabletter*

Til FST med hele depottabletter ble 1 depottablett overført til FTC (tablettcelle). Til FST med delte depottabletter ble 1 stykk depottablett knekt for hånd i to deler ved tablettens delestrek. Begge halvdelene ble overført til FTC.

I forsøk der FST ble utført med flere depottabletter parallelt, var håndtering av tablett lik den beskrevet ovenfor for alle depottablettene som ble testet.

Vekt (Sartorius Extend) til hver depottablett ble registrert før manipulering og overføring til FTC.

#### *Depottabletter knust til homogen pulverblanding*

1 stykk depottablett ble knust til en homogen pulverblanding i porselensmorter.

Pulverblandingene ble overført til FTC (tablettcelle eller original - eller revidert pulver - og granulatcelle) og tarert vekt registrert. I forsøk der FST ble utført for flere knuste

depottabletter parallelt, ble alle depottablettene håndtert som beskrevet over, men knust i hver sin porselensmorter.

#### *Depottabletter forsiktig knust (granulatkorn forsøkt bevart)*

Theo-Dur® 300 mg depottabletter ble håndtert som beskrevet for *depottabletter knust til homogen pulverblanding*, med unntak av at depottablettenes pellets/granulatkorn ble forsøkt bevart intakte ved knusing i morter.

### 2.2.3 Etterbehandling og analyse av prøver fra frisettingstester (FST) i apparat 4

Prøvene fra ble filtrert gjennom sprøytefilter (CA-membran, 25 mm diameter, 0,22 µm porestørrelse, VWR®). 5 mL av hver prøve ble trukket opp i en målesprøyte (5-mL steril Luer lock steril målesprøyte Fisherbrand®). Første 4 mL filtrat til hver prøve ble forkastet og siste 1 mL av filtratet ble overført til HPLC- prøvebeholderen og plassert i HPLC.

Til fortynning av prøver ble det brukt rensset vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) og finpipetter (100–1000 µL og 0,5–5 mL, Thermo scientific ®) til uttak av kjent prøvevolum. Det ble brukt målekolber (10 mL og 25 mL, Duran®) til å fortynne prøve til ønsket volum. Fortynnet prøve ble filtrert før overføring til HPLC-beholderen, som beskrevet i avsnittet over. Prøvene ble analysert i HPLC med UV-deteksjon (innstilt bølgelengde 272 nm) med gradient elueringsmetode (se beskrivelse i kapittel 3.2.1 og tabell x i kapittel 3.2.2) og ACE-kolonne (spesifikasjoner gitt i kapittel 2.5.1).

## 2.3 HPLC

### 2.3.1 Utstyr

#### *HPLC-apparat, detektor og programvare*

Revers fase kromatografi med absorpsjon av UV-lys som deteksjonsmetode ble brukt som metode for analyse av prøver og til kalibrering. HPLC-apparatet var av type 1260 Infinity, fra Agilent Technologies med tilhørende pumpe (DEAB807239), autosampler (DEAAC14050), UV-detektor (G1314F, 1260 VWD, Agilent Technologies) og programvare for HPLC-systemet (OpenLab ChemStation, Agilent). Innstilt bølgelengde for UV-detektor var 272 nm.



### HPLC-kolonner

Analysene ble utført i HPLC tilkoblet én C18-kolonne med tilhørende forkolonne (guard). Ulike C18-kolonner ble forsøkt gjennom prosjektet; Poroshell installert (Poroshell 120 SB-C18, Agilent, prod.nr: 685975-902, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale. Forkolonne; UHPLC Guard 3 pk, InfinityLab Poroshell 120 SB-C18, 4,6 x 5 mm diameter og 2,7 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale, Agilent) og ACE (ACE 5 C<sub>18</sub>, prod.nr: ACE-121-2546, 4,6 mm x 250 mm, 5µm partikkelstørrelse på pakkematerial). Det ble også brukt en kolonne av typen Eclipse Plus (Eclipse Plus C18, Agilent, prod.nr: 959961-902, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale) til forsøk som er beskrevet i appendiks 3.

### Mobilfaser

**Isokratisk elueringsmetode:** Ukjent opprinnelse på de organiske løsemidlene, hentet fra kjemikalielageret ved Nord universitet. Vann med HPLC-kvalitet: HiPerSolv CHROMANORM® for HPLC fra VWR®.

**Gradient elueringsmetode:** Innkjøp av organiske kjemikalier med dokumentert HPLC-kvalitet: Metanol EMSURE® fra Sigma- Aldrich, Ethyl acetate VWR® fra BDH Chemicals, Hexan LiChrosolv® fra Sigma-Aldrich og rensset vann fra smart2pure pro, Thermo Scientific (ASTM type 1, ultrapure). Metanol og heksan ble filtrert før overføring til HPLC-beholdere for mobilfase (Bottle top vacuum filters VWR®, med SFCA-membran, 0.22 µm porestørrelse til filtrering av metanol og med PA/nylon-membran, 0.45 µm porestørrelse for filtrering av heksan). Etylacetat ble ikke filtrert på grunn av reaksjon med materiale i filterhus.

### 2.3.2 Kalibrering

Det ble brukt ekstern standard og minste kvadraters metode for konsentrasjonsbestemmelse av teofyllin i prøvene etter FST med Theo-Dur® depottabletter (68).

Standardløsninger med kjent konsentrasjon av teofyllin ble analysert med tre målereplikater. Gjennomsnittsarealet [mAU\*s] fra hver standardløsning ble plottet mot sin korresponderende konsentrasjon [mg/L]. Fra analyse av standardløsninger med kjente teofyllinkonsentrasjoner ble verdier for toppareal [mAU\*s] fra alle standardløsningenes målereplikater ført inn og plottet mot korresponderende konsentrasjon [mg/L] (Microsoft® Excel for Mac, versjon

16.72). Det ble laget en kalibreringskurve (regresjonslinje) med regresjonsligning, og verdien for regresjonskoeffisienten ( $R^2$ ) ble beregnet. Lineariteten til standardkurven ble vurdert fra verdien til  $R^2$ , og en visuell vurdering av kalibreringskurven (plassering av datapunktene i forhold til regresjonslinjen). Kun kalibreringskurver med  $R^2 \geq 0,998$  der standardløsninger med minimum 5 ulike konsentrasjoner var analysert ble brukt til kvantifisering av teofyllin i prøvene (se ligning 2, for rett linje).

$$y = ax + b$$

Ligning (2)

Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik til hver standard ble beregnet (80).

Kalibrering av HPLC skjedde ukentlig så lenge forsøkene pågikk.

Konsentrasjon av teofyllin i prøver med ukjent teofyllinkonsentrasjon ble beregnet fra areal målt etter HPLC-analyse og regresjonsligningen etter kalibrering av HPLC (se ligning 2).

Beregningene ble kun utført for de prøvene som hadde arealer innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde.

## 2.4 Databehandling av resultater

Dataene fra HPLC-analyser ble lagret både internt på PC tilhørende HPLC og kopiert til ekstern lagringsenhet. Videre ble resultatene overført og lagret i Excel-regneark (Microsoft® Excel for Mac, versjon 16.72). Beregninger og grafisk fremstilling ble utført i Microsoft® Excel, med unntak av figur 15. 4.2.4. lineær kalibreringskurve som ble laget i Numbers (versjon 12.1 (7034.0.86) Apple. Inc). For data som ble sjekket for normalitet ble dette utført med Shapiro-Wilk test i RStudio (Versjon 2023.03.0+386) hvor normalfordeling antas ved  $P > 0.05$  (81).

### 3. Metodeutvikling

Metodeutviklingen ble planlagt som en trinnvis prosess der man «stein for stein» bygget opp en metode tilpasset prosjektets formål. Dette skulle foregå gjennom flere mindre delforsøk, der et nytt delforsøk baserte seg på resultatene og erfaringene fra forrige delforsøk. Hensikten var å få bedre oversikt og kontroll over forsøksparametere og hvordan de påvirket utviklingen av metoden.

#### 3.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent

I disse forsøkene ble det brukt C18 HPLC-kolonne av typen Poroshell 120, SB-C18-kolonne, 4,6 x 100 mm, 2,7  $\mu\text{m}$  partikkelstørrelse på pakkemateriale.

##### 3.1.1 Kartlegging av bølgelengde for maksimal UV-absorbans for teofyllin

For å få en deteksjonsmetode med stor grad av følsomhet var det ønsket å innstille UV-detektoren til bølgelengden der teofyllin har maksimal absorpsjon av UV-lys ( $\lambda_{\text{max}}$ ) (82). Hensikten med dette forsøket var å finne maksimal absorpsjon av UV-lys til teofyllin ( $\lambda_{\text{max}}$ ). Dette ble både undersøkt i litteratur (37,83) og eksperimentelt (Shimadzu UV-1700, pharmaspec).

##### Metodebeskrivelse

To standardløsninger av teofyllin (monohydrat) ble laget med konsentrasjoner 20 mg/L og 5 mg/L (som angitt i kapittel 2.1.4). En liten mengde av standardløsningen ble tatt ut og overført med pipette til en kvartskuvette (10 x 10 mm). Renset vann (N.Nlab, i kvartskuvette) ble brukt som referanse (baseline) og UV-spektrofotometer ble nullstilt før undersøkelsen til hver standardløsning. UV-spekter ble tegnet i apparatets display, bølgelengde ved målt maksimal UV-absorbans ble lest av og notert fra skjermen til apparatet.

##### 3.1.2 Isokratisk elueringsmetode: Deteksjon av teofyllin og kartlegging av mobilfasesammensetting

I dette forsøket ble det utført flere HPLC-analyser av prøver med teofyllin standardløsning. Innstillingen for UV-detektoren ble valgt som følge av funnene i forrige forsøk (se kapittel 3.1.1). Hensikten med dette forsøket var å undersøke signalet fra teofyllin fra detektor for å finne en egnet mobilfasesammensetting for analysemetoden.

## Metodebeskrivelse

Prøver fra standardløsning med konsentrasjon 20 mg/L (laget i forsøk forsøk 3.1.1 *kartlegging av bølgelengde for maksimal UV-absorbans for teofyllin*) ble analysert i HPLC. Innstilt bølgelengde for UV-deteksjon var 272 nm. Det ble brukt isokratisk eluering med vann og metanol som mobilfase. Mobilfasesammensetningen i hver analyse er vist i tabell 3. Ved første analyse ble det brukt en høy andel metanol (90%) i mobilfasen, som ble nedjustert suksessivt for hver analyse-runde. Resultatene ble vurdert med hensyn på retensjonstid og formen på toppen i kromatogrammet.

**Tabell 3:** Sammensetning av vann og metanol ved kartlegging av mobilfasesammensetning ved HPLC-analyser med isokratisk eluering. Prøvene var en løsning av teofyllin [20 mg/L], injeksjonsvolum var 10 µL og hastighet til mobilfase var 0,6 ml/min.

	Mobilfasesammensetning [%v/v]								
Vann	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Metanol	90	80	70	60	50	40	30	20	10

Elueringsmetoden ble forsøkt ytterligere forbedret ved å teste følgende sammensetning av vann og metanol (i prosent); 85:15 (vann:metanol), 83:17 (vann:metanol), og 80:20 (vann:metanol). For å være sikker på at prøven ikke inneholdt forurensning ble en analyse gjort over 20 minutter (83% vann og 17% metanol).

### 3.1.3 Undersøkelse av linearitet (håndteringsanalyse 1)

Dette forsøket hadde til hensikt å sjekke at HPLC-metode med isokratisk eluent ga arealer som var proporsjonale med mengden teofyllin i standardløsninger med ulike teofyllinkonsentrasjoner: lineært forhold mellom konsentrasjon og korresponderende konsentrasjon). Dette var viktig å undersøke fordi et proporsjonalt forhold var en forutsetning for videre utvikling av et kalibreringssystem. Kromatografiske betingelsene i dette forsøket var basert på resultatene fra HPLC-analysene i forrige forsøk (se kapittel 3.1.2 og 4.1.2 for metode og resultat). Det ble brukt isokratisk eluering med 83% vann og 17 %, injeksjonsvolum var 10 µL, hastighet til mobilfase var 0,6 ml/min og innstilt bølgelengde for UV-deteksjon var 272 nm. Metoden omtales heretter som isokratisk elueringsmetode, og dette forsøket omtales videre som *håndteringsanalyse 1*.

### Metodebeskrivelse

En serie standardløsninger med ulike teofyllinkonsentrasjoner ble laget (2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L, (som angitt i kapittel 2.1.4). Prøver med standardløsning fra hver konsentrasjon ble analysert i HPLC.

#### 3.1.4 Håndteringsanalyse 2: Undersøkelse av linearitet, forsøk repetert

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om resultatene i håndteringsanalyse 1 lot seg repetere eller om resultatet kunne være en konsekvens av tilfeldigheter.

### Metodebeskrivelse

En ny serie standardløsninger (2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L, se kapittel 2.1.4) ble laget og analysert med samme metoder som håndteringsanalyse 1 (se kapittel 3.1.3). Kromatogrammene fra håndteringsanalyse 2 ble sammenlignet med kromatogrammene håndteringsanalyse 1.

## 3.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4

Fordi isokratisk elueringsmetode med 83% vann og 17% metanol basert på 83:17 viste seg å gi betydelige utfordringer med trykk og tetting av HPLC-kolonnen (se appendiks 3), ble det bestemt å bruke gradient eluering i det videre arbeidet.

### 3.2.1 Utprøving av ny HPLC-kolonne og gradient elueringsmetode

I samarbeid med Egeland ble det laget et forslag til en gradient elueringsmetode for HPLC. Det ble brukt en helt ny C<sub>18</sub>-kolonne til dette forsøket (ACE) og tilhørende forkolonne (også ACE). Løsemidlene som ble brukt til gradient eluering hadde mobilfasehastighet på 1 mL/min, i rekkefølgen (minutter, % løsemiddel A, % løsemiddel B, % løsemiddel C, % løsemiddel D); (0, 79.9, 20, 0, 0.1), (20, 0, 99.9, 0, 0.1), (22, 0, 0, 99.9, 0.1), (24, 0, 0, 0, 100), (26, 0, 0, 99.9, 0.1), (28, 0, 99.9, 0, 0.1), (30, 79.9, 20, 0, 0.1). Løsemiddel A var vann, løsemiddel B var metanol, løsemiddel C var etylacetat og løsemiddel D var heksan. Det ble lagt inn 5 minutter re-ekvivalering av kolonne etter endt analyse. Sammensetningen av løsemidlene var her den samme som beskrevet ved tidspunkt 0 minutter).

Hensikten med disse forsøkene var å teste om gradient elueringsmetode (presentert over) var egnet som analysemetode i prosjektet. For å sjekke dette ble metoden først testet på prøver med løsninger av rent teofyllin anhydrat. For å teste metodens evne til å håndtere prøver med både teofyllin og hjelpestoffer, ble metoden testet på prøver med løsninger av teofyllin fra depottablett.

#### HPLC-analyse: Prøver med løsninger av rent teofyllin

##### Metodebeskrivelse

En standardløsning av teofyllin (anhydrat) ble laget med konsentrasjon 20 mg/L (som angitt i kapittel 2.1.5). Prøven ble analysert i HPLC med gradient elueringsmetode (beskrevet tidligere i dette kapitlet). Først ble analysen av prøven testet med injeksjonsvolum 10 µL. Deretter ble analysen av prøven testet med injeksjonsvolum 50 µL. Resultatene fra analysene ble vurdert med hensyn på retensjonstid og formen på toppen i kromatogrammet.

#### HPLC-analyse: Prøver med løsninger av teofyllin fra depottablett

##### Metodebeskrivelse

En løsning av teofyllin ble laget som beskrevet i kapittel 2.1.6 (*Løsning 1*). En mengde av løsningen ble overført til fire HPLC-prøvebeholdere og plassert i HPLC. Prøvene ble analysert med gradient elueringsmetode (beskrevet tidligere i dette kapitlet). Første prøve hadde et injeksjonsvolum 30 µL. Injeksjonsvolumet for de tre andre prøvene ble deretter økt til 50 µL.

### 3.2.2 Etablering av lineært måleområde og kalibrering av HPLC

Som følge av resultatene fra forrige forsøk ble det videre valgt å bruke HPLC-metode med gradient eluent, mobilfasesammensetningene var den samme som beskrevet i kapittel 3.3.1. Øvrige analysebetingelser er vist i tabell x.

**Tabell 4:** Analysebetingelsene for HPLC-analyse med gradient elueringsmetode.

Kolonne	ACE 5 C <sub>18</sub> , prod.nr: ACE, 4,6 mm x 250 mm, 5µm partikkelstørrelse på pakkematerial
Mobilfasehastighet	1 ml/min
Injeksjonsvolum	50 µL
Bølgelengde UV-detektor	272 nm

Kolonnetemperatur	Romtemperatur
Analysetid	30 minutter (+ 5 minutter re-ekvivalering av kolonne)

Hensikten med disse undersøkelsene var å undersøke HPLC-metodens evne til å gi et proporsjonalt forhold mellom teofyllinkonsentrasjonen i standardløsningene og detektorsignalet (areal til topp), og ved hvilke konsentrasjoner en slik proporsjonalitet kunne forventes.

### Metodebeskrivelse

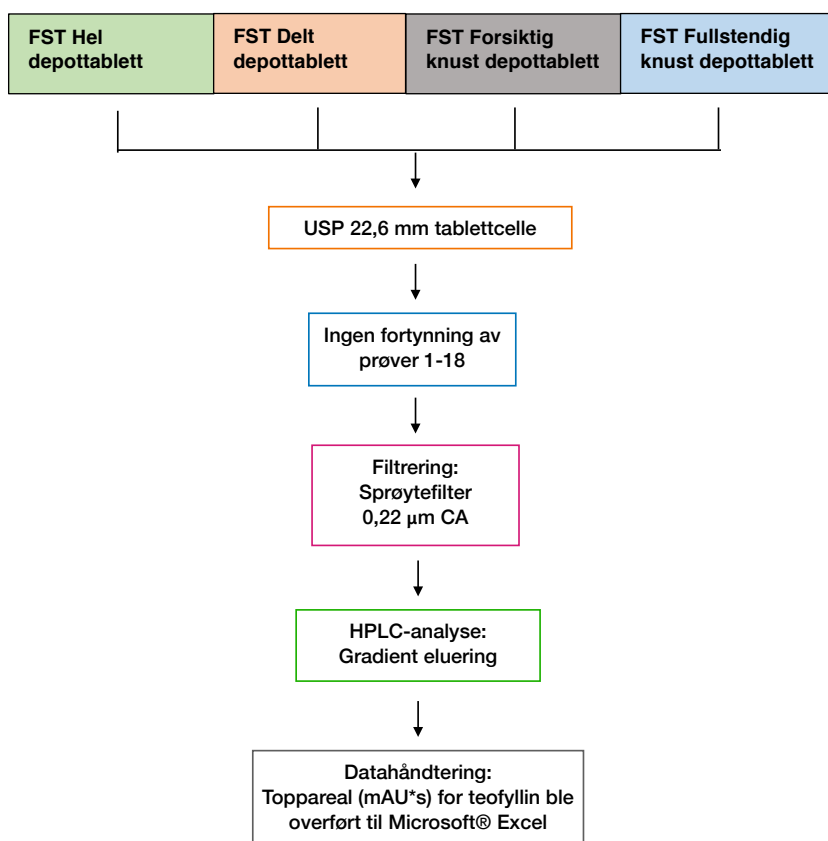
Først ble det laget en serie med 4 standardløsninger med konsentrasjonene 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L (som angitt i kapittel 2.1.5). Prøveserien ble analysert i HPLC med gradient elueringsmetode (se tabell x), tre målereplikater av hver prøve. Linearitet ble undersøkt på samme måte som beskrevet i kapittel 2.3.2 *Kalibrering*. Videre ble det laget flere standardserier med ulike rekkevidder for konsentrasjons, og lineariteten ble sammenlignet. Undersøkelsene pågikk til dels samtidig med de første forsøkene med depottablett i apparat 4. Konsentrasjonsområdet til standardseriene ble etter hvert forsøkt tilpasset arealene fra prøvene etter FST.

### 3.2.3 Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett

Hensikten med disse forsøkene var å kartlegge arealene fra HPLC-analyse til prøvene fra FST av hele og manipulererte Theo-Dur® depottabletter for å tilpasse prøvenes måleområde med kalibreringskurvens konsentrasjonsområde. Gjennom forsøket ville man også få undersøkt hvordan apparat 4 og oppsett til tablettcelle (se kapittel 2.2.1) håndterte hele og manipulererte Theo-Dur® depottabletter.

### Metodebeskrivelse

Det ble først utført FST i apparat 4 med 1 stykk hel depottablett, deretter 1 stykk delt depottablett, 1 stykk forsiktig knust depottablett og til sist homogen pulverblanding av 1 stykk knust depottablett. FST ble utført med tablettcelle (se kapittel 2.2.1). Kun FTC 1 var tilkoblet og fikk tilførsel av oppløsningsmedia (vann). Prøvene ble i HPLC. FST med hel depottablett ble repetert for å se om det var stort sprik i arealene sammenlignet med den første FST. Arealene til prøvene fra FST ble sammenlignet med arealene fra kalibreringskurvene med konsentrasjonsområde 2 mg/L – 40 mg/L ( $\pm 1\%$ ). Forsøkene er vist i flytdiagram se figur 10.



**Figur 10:** Flytdiagram som viser de første forsøkene med FST av Theo-Dur® depottabletter i apparat 4, prøveopparbeidelse og analyse.

### 3.2.4 Frisettingstester i apparat 4, av hel og delt depottablett med fortykning av prøvene

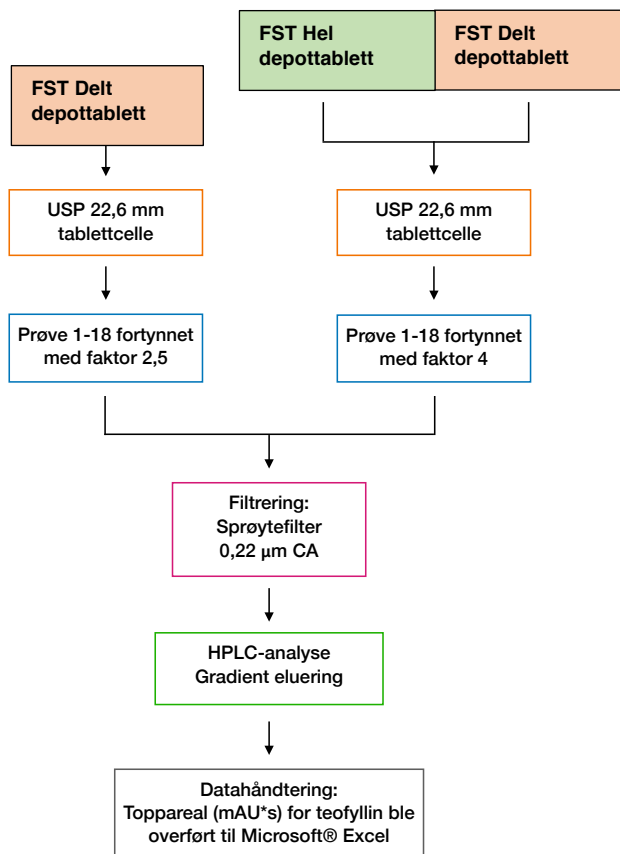
Hensikten med disse forsøkene var å teste om fortykningsprosedyrene gav prøver med måleområder innenfor konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven, etter FST av hele og delte depottabletter. Fortynningsfaktorene ble valgt basert på arealene i prøvene som ble målt i HPLC i forrige forsøk (beskrevet i forrige kapittel) og gjennomførbarheten til fortykningen med tanke på tilgjengelig laboratoriestyr.

#### Metodebeskrivelse

Fremgangsmåten i dette forsøket var den samme som beskrevet for hele og delte depottabletter i forrige forsøk (se kapittel 3.2.3), med unntak av at prøvene i dette forsøket ble fortynnet før HPLC-analysen (se figur x). Volumet til alle prøvene fra FST ble målt (25 mL



målesylinder,  $\pm 0.5$  mL, VWR®) og registrert. Først ble det utført FST av delt depottablett der samtlige prøver ble fortynnet med faktor 2,5. Deretter ble FST av delt depottablett gjentatt, der samtlige prøver ble fortynnet med faktor 4. Til slutt ble det utført FST av hel depottablett, der alle prøvene ble fortynnet med faktor 4. Arealene fra hver FST ble registrert i Microsoft Excel®, og sammenlignet med den tilhørende kalibreringskurvens arealer (konsentrasjonsområde 2,02 mg/L – 40,4 mg/L,  $\pm 1\%$ ). Metodebeskrivelsen er oppsummert i et flytskjema, se figur 11.



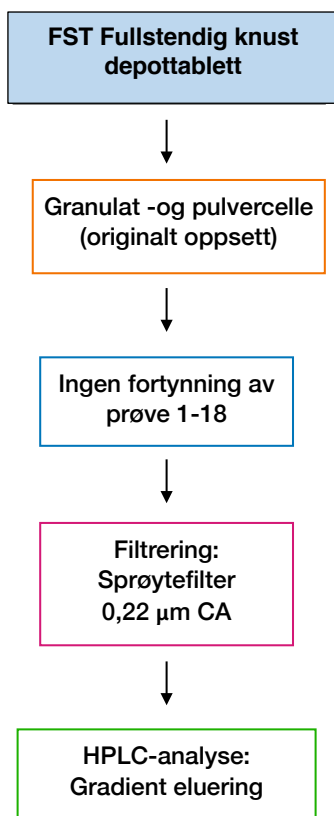
**Figur 11:** Flytdiagram for FST med hele og delte Theo-Dur® depottabletter i apparat 4, prøveopparbeidelse og analyse.

### 3.2.5 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om granulat -og pulvercelle forbedret prøveoppsamlingen i FST av knust tablett (homogen pulverblanding) sammenlignet med FST i tablettcellen.

## Metodebeskrivelse

FST ble utført i granulat -og pulvercelle med depottablett knust til homogen pulverblanding (omtales heretter som knust depottablett). Oppsettet av FTC var som beskrevet i kapittel 2.2.1 (*granulat -og pulvercelle, originalt oppsett*). Volumet til alle prøvene fra FST ble målt (25 mL målesylinder,  $\pm 0.5$  mL, VWR®) og registrert. Til dette forsøket ble det ikke laget en kalibreringskurve, og prøvenes arealer ble sammenlignet med kalibreringskurven fra tidligere forsøk. Se flytskjema for oppsummering av metodebeskrivelsen (figur 12)



**Figur 12:** Flytskjema for FST i apparat 4 av Theo-Dur® depottablett knust til homogen pulverblanding (fullstendig knust), med prøveopparbeidelse og analyse.

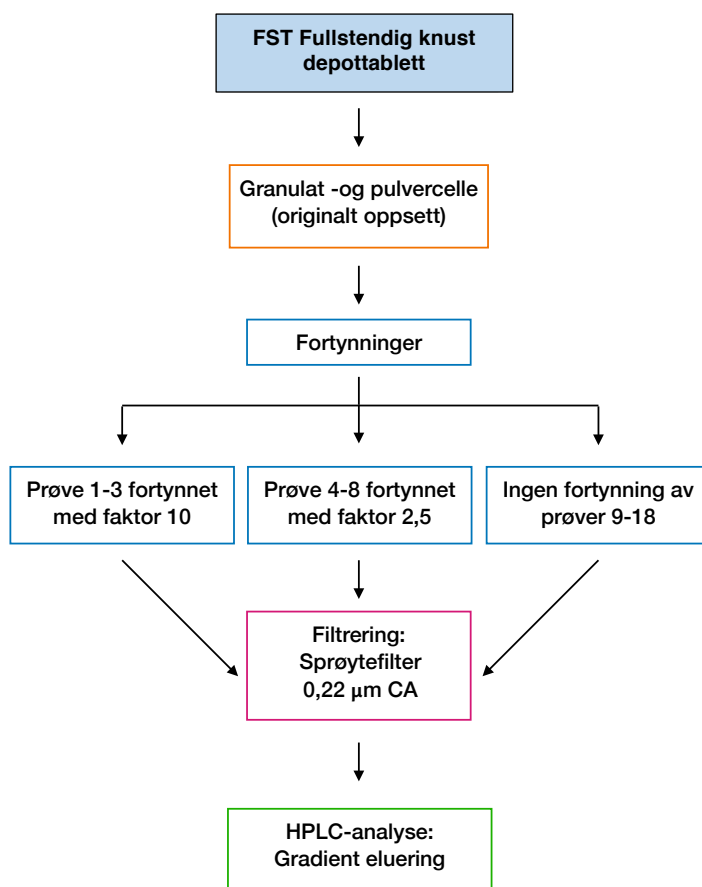
### 3.2.6 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortykning av prøver

Hensikten med disse forsøkene var å utarbeide en egnet fortykningsprosedyre for prøvene etter FST med knuste depottabletter. Fortynningsfaktorene for prøvene ble valgt med hensyn til arealene målt i prøvene fra forrige FST i granulat -og pulvercelle, (se kapittel 3.2.5 og 4.2.5

for metodebeskrivelse og resultater) og gjennomførbarheten til fortynningen i forhold til tilgjengelig laboratoriestyr.

### Metodebeskrivelse

Forsøket ble utført som beskrevet for FST av knust depottablett i granulat -og pulvercelle (se forrige kapittel) med unntak av fortynningsprosedyren som er vist i figur 13. Volumet til alle prøvene fra FST ble målt (25 mL målesylinder,  $\pm 0.5$  mL, VWR®) og registrert.



**Figur 13:** Flyttdiagram for FST i apparat 4 av Theo-Dur® depottablett knust til homogen pulverblanding (fullstendig knust), med prøveopparbeidelse, fortynninger av prøver og analyse.

### 3.3 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4

Hensikten med disse forsøkene var å undersøke variasjonen i resultatene fra flere FST utført under samme forhold. Dette ble sjekket for hele, delte og knuste depottabletter. Arealene fra HPLC-analysen av alle prøvene fra hvert tidsintervall i FST ble registrert i Microsoft Excel®. Konsentrasjon (mg/L) og masse (mg) av teofyllin i hver prøvene ble beregnet fra

kalibreringskurvens regresjonsligning (se appendiks 5). Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik ble hvis mulig beregnet for konsentrasjon og masse for prøvene fra hvert tidsintervall, og brukt som mål på sentraltendens og spredning i resultatene (84). For resultater der konsentrasjonen i prøvene ikke kunne beregnes, ble målt areal brukt som grunnlag for å vurdere variasjonen i resultatene.

### 3.3.1 Triplett frisettingstest av hele og delte depottabletter

#### *Test H1, H2, D1 og D2: Tablettcelle*

##### Metodebeskrivelse

FST i triplett ble utført i to runder (totalt, n=6) med hele Theo-Dur® depottabletter (test H1 og test H2) og i to runder (totalt, n=6) med delte Theo-Dur® depottabletter (test D1 og D2). Dette ble utført i apparat 4 med tre tilkoblede tablettceller, oppsatt som beskrevet i kapittel 2.2.2. Prøvene fra hver FST ble fortynnet med faktor 4 før HPLC-analyse, gradient eluering. Konsentrasjonene beregnet i prøvene fra test H1 og H2 ble sjekket for normalitet med Shapiro-Wilks test. Volum til prøvene ble målt og registrert i én av tripllettene med hele depottabletter, og i begge tripllettene med delte depottabletter (25 mL målesylinder, ± 0.5 mL, VWR®). For å undersøke om avvik i prøvevolum kunne skyldes innholdsstoffer fra depottabletten eller utfordringer med apparat 4, ble test D2 gjennomført med tilkobling av en ekstra FTC uten depottablett. Denne var oppsatt på samme vis som de øvrige tre FTC, men uten legemiddel til stede. Volum til prøvene fra denne ble målt og registrert. Videre ble volumene fra FTC 4 sammenlignet med volum til FTC 1-3 med depottablettene.

### 3.3.2 Triplett frisettingstest av knuste depottabletter

#### *Test K1: Originalt oppsett av granulat -og pulvercelle*

##### Metodebeskrivelse

Test av oppløsningshastighet i triplett (test K1) ble utført i apparat 4 med granulat -og pulverceller, originalt oppsett; hver tilsatt homogen pulverblanding fra 1 stykk knust depottablett. Oppsettet av FTC var som beskrevet i kapittel 2.2.1 (*granulat -og pulvercelle, originalt oppsett*). Prøvene ble behandlet og analysert som beskrevet i øvrige forsøk med FST og fortynnet som vist i tabell 5. Arealene ble registrert i Microsoft Excel®, og sammenlignet

med konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven. Volumet til alle prøvene fra FST ble målt (25 mL målesylinder,  $\pm 0.5$  mL, VWR®) og registrert.

Etter at prøvene fra tidsintervall 1 og 2 var analysert, ble det oppdaget at feil fortynningsfaktor var brukt på de første to prøvene. Derfor ble HPLC-prøvebeholderne hentet ut og lagret over natten i kjøleskap. Prøvene fra første tidsintervall ble fortynnet på nytt (se siste kolonne i tabell 6 for korrigert fortynningsfaktor) og re-analysert. Prøvene fra tidsintervall nummer 2 ble også re-analysert og arealet ble sammenlignet med arealet fra første analyse for å se om det var tegn til stabilitetsproblemer. Re-analysene ble utført umiddelbart etter at øvrige prøver fra oppløsningstesten var fullført.

**Tabell 5:** Fortynningsfaktorer benyttet til fortynning av prøver fra FST i triplett (test K1) av knuste Theo-Dur® depottabletter ved bruk av granulater og pulverceller, originalt oppsett.

Prøve fra tidsintervall [nr]	1	2	3	4	5	6-18	1*
Fortynningsfaktor	10	10	5	5	5	1	142,857

\*Korrigert fortynningsfaktor etter ny fortynning av prøve nr. 1

### *Test K2 og K3: Revidert oppsett av granulater og pulverceller*

#### Metodebeskrivelse

Disse FST (K1 og K2) ble utført i triplett i apparat 4 med tre tilkoblede granulater og pulverceller med revidert oppsett (se kapittel 2.2.1 *granulater og pulverceller, revidert oppsett*). Fremgangsmåten i forsøket var ellers den samme som metodebeskrivelsen til forsøk K1, med unntak av endring i fortynninger av prøvene (se tabell 6). Arealene ble registrert i Microsoft Excel®, og sammenlignet med konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven. Konsentrasjon og masse teofyllin ble beregnet i de prøvene som hadde arealer som lå innenfor konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven.

**Tabell 6:** Fortynningsfaktorer benyttet til fortynning av prøver for FST i tripletter (test K2 og test K3) av knuste Theo-Dur® depottabletter ved bruk av granulater og pulverceller, revidert oppsett.

K2		K3	
Tidsintervall [nr]	Fortynningsfaktor	Tidsintervall [nr]	Fortynningsfaktor
1	50	1	50
2	20	2	20
3	4	4 - 10	4
4	2	11 - 12	2
5 - 18	1	13 - 18	1

### 3.4 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode

Opprinnelig var det planlagt å validere ferdig utviklede metoder i siste del av metodeutviklingen; FST under simulerte GI-betingelser, med kunstig mage- og tarmsaft som oppløsningsmedia. På slutten av prosjektperioden ble det klart at dette ikke var realistisk å oppnå. Det ble likevel forsøkt å undersøke noen prosessvariabler. Hensikten var å nærmere undersøke noen av faktorene som kan tenkes å bidra til variasjon i resultatene fra FST. På grunn av lite gjenstående tid for laboratorieundersøkelser ble det kun undersøkt parametere knyttet til nøyaktighet til HPLC-analysen med gradient eluering, stabiliteten til teofyllin i en vandig løsning og bruk av sprøytefiltrering. Dette var ikke ment å være en metodevalidering, da metodeutviklingen fremdeles var i en tidlig fase sett i forhold til målsettingen i prosjektbeskrivelsen (se kapittel 1.8).

#### 3.4.1 Undersøkelse av stabilitet til løsninger med teofyllin

Hensikten med disse forsøkene var å undersøke om stabilitet av teofyllin i prøvene kunne være problematisk når det gjaldt varigheten til FST og påfølgende lang analysetid. Stabilitet til løsninger med teofyllin ble undersøkt med to forsøk. Av praktiske og tidsmessige årsaker var disse forsøkene svært enkle. Prinsippet var å sammenligne gjennomsnittsarealet til en referanseprøve (baseline) med gjennomsnittsarealet til prøver som var utsatt for bestemte betingelser (tid og temperatur i vannbad) (85).

#### Metodebeskrivelser

Løsningene med teofyllin ble i dette forsøket filtrert gjennom sprøytefilter (CA-membran, 0,22 µm porestørrelse) før overføring til HPLC-prøvebeholdere, analysert i tre målerekopier

i HPLC med gradient elueringsmetode og gjennomsnittsarealet (mAU\*s) for hver prøve ble beregnet. Differansen mellom arealene fra prøvene som var utsatt for ulike oppbevaringsbetingelser og arealet til referanseprøven ble deretter funnet. Denne ble angitt som prosent avvik fra referanseprøven. Gjennomsnitt, standardavvik, og relativt standardavvik (RSD) ble beregnet og brukt til å vurdere sentraltendens og spredningen i resultatene.

#### Stabilitetstest, løsning med rent teofyllin i vannbad

En standardløsning av teofyllin med konsentrasjon 20 mg/L ble laget (se kapittel 2.1.5). Videre ble en prøve med standardløsning analysert umiddelbart i HPLC. Fire prøver med standardløsning ble oppbevart i vannbad med temperatur 37,0 C. For ekstra temperaturkontroll i vannbadet ble et glasstermometer også satt inn i vannbadet. Temperaturen ble jevnlig kontrollert på dagtid så lenge forsøket varte. Etter henholdsvis 4, 8, 24 -og 48 timer ble en prøve fra vannbadet hentet og analysert i HPLC.

#### Stabilitetstest, løsning med teofyllin fra knust depottablett i vannbad

Det ble laget en løsning av teofyllin fra Theo-Dur® depottabletter som beskrevet i kapittel 2.1.6 *Løsning 2*. En prøve fra denne løsningen ble analysert umiddelbart i HPLC. De andre to prøvene ble oppbevart i vannbad, med samme forsøksbetingelser som beskrevet i avsnittet over. Etter 24 -og 48 timer ble en prøve fra vannbadet hentet og analysert i HPLC.

### 3.4.2 Recovery-forsøk: Evaluering av analysemetodens nøyaktighet

Det ble forsøkt å undersøke analysemetodens nøyaktighet i form av mengde teofyllin gjenfunnet i prøve (engelsk; recovery). Det var ikke tilgjengelige materialer for å undersøke dette ved «å spike» prøver med kun hjelpestoffer av Theo-Dur® (placeboprøver) med en kjent mengde referansestandard tilsatt, for så å se hvor stor andel som kan gjenfinnes i analysen (85,86). Det ble derfor forsøkt å undersøke nøyaktigheten til analysemetoden på andre måter. Dette ble utført ved å sammenligne analyseresultater fra en løsning av teofyllin laget fra en kjent mengde homogen pulverblanding fra knuste depottabletter, og en løsning av teofyllin laget av sammen mengde homogen pulverblanding, men tilsatt en kjent mengde rent teofyllin (referansestandard). Det ble også laget en løsning av teofyllin kun fra referansestandard (samme masse som ble tilsatt som «spike» i sistnevnte løsning).

Recovery ble evaluert basert på hvor stor andel av tilsatt teofyllin referansestandard som ble gjenfunnet etter analysen av prøvene (87). For å beregne gjenfunnet mengde referansestandard i en prøve, ble teofyllinmengden målt i prøven fra med teofyllin fra knuste depottabletter trukket fra. Prosent av gjenfunnet referansestandard («recovery») ble da beregnet som vist i ligning 3 (88).

$$Recovery = \frac{\text{Referansestandard tilsatt [mg]}}{\text{Referansestandard igjenfunnet [mg]}} \times 100\%$$

Ligning 3

### Metodebeskrivelse

Tre løsninger med teofyllin fra både knuste depottabletter og teofyllin anhydrat ble laget i tre runder som beskrevet i kapittel 2.1.6 *Løsning 3*. Uttak av pulver fra knust depottablett ble gjort fra den samme homogene pulverblandingen for alle tre løsningene.

Mengde teofyllin anhydrat tilsatt hver av de tre løsningene (i tillegg til 50 mg pulverblanding knust depottablett) var 23,5 mg. Mengden med teofyllin tilsvarte samme mengde teofyllin som var forventet å være i 50 mg homogen pulverblanding, basert på deklarerert mengde teofyllin fra produsenten og gjennomsnittsvekten til de tre knuste depottablettene.

Deretter ble det laget en løsning av teofyllin fra 23,5 mg teofyllin anhydrat pulver (som angitt i kapittel 2.1.3 *Andre løsninger av teofyllin fra teofyllin anhydrat*) og

og én løsning med teofyllin fra knust depottablett (som angitt i kapittel 2.1.6 *Løsning 2*).

Pulver av knuste depottabletter ble hentet fra samme homogene pulverblandingen som brukt til å lage løsningene som først beskrevet i metodebeskrivelsen i forsøket. Begge løsningene ble sonikert, filtrert og fortynnet på samme måte som teofyllinløsningene i de tre forutgående rundene. Til slutt ble en prøve fra hver av løsningene overført til HPLC-prøvebeholder og analysert i HPLC med gradient elueringsmetode, med tre målereplikater.

### 3.4.3 Bestemmelse av mengde teofyllin i Theo-Dur® Depottabletter i HPLC-UV

Hensikten med disse undersøkelsene var å bestemme mengden av teofyllin i Theo-Dur® depottabletter i HPLC med gradient elueringsmetode. Resultatene ble brukt som supplerende



data for å evaluere nøyaktighet til analysemetode (se forrige forsøk, recovery) ved å undersøke om det var store sprik mellom teofyllin gjenfunnet med vår analysemetode med HPLC og produsentens innholdsdeklarasjon (300 mg per dose).

### Metodebeskrivelse

På tre ulike dager ble det ble laget tre løsninger (prøvereplikater) av knuste depottabletter, som beskrevet i kapittel 2.1.6 *Løsning 2*. Prøvereplikatene ble analysert i HPLC med gradient elueringsmetode. Alle prøveplikatene, unntatt for dag 1, ble analysert med 3 målereplikater hver. Teofyllinkonsentrasjonen i hver av prøveplikatene ble beregnet fra gjennomsnittetsarealet. Gjennomsnittsvekten til de tre depottablettene og innholdsdeklarasjonen til Theo-Dur® depottabletter (300 mg) ble brukt for å finne mengden av teofyllin som var forventet å være i 1 mg depottablett. Forholdet mellom mengden teofyllin som ble funnet etter analysen og den forventede mengden av teofyllin ble sammenlignet i form av andel gjenfunnet masse (recovery). Variasjonen ble undersøkt med relativt standardavvik (for  $n = 9$ ) til mengden teofyllin som ble påvist i prøveplikatene fra de ulike dagene. Data ble sjekket for normalitet ved test Normalitet til dataene ble undersøkt med Shapiro-Wilk test i RStudio (Versjon 2023.03.0+386).

### 3.4.4 Undersøkelse av sprøytefiltrering

Hensikten med disse undersøkelsene var å undersøke tegn til om filtrering av teofyllinløsninger kunne påvirke analyseresultatene, eksempelvis adsorpsjon av teofyllin i filter eller utvasking av stoffer fra filter (75).

#### *Filtertest 1*

### Metodebeskrivelse

En standardløsning med teofyllinkonsentrasjon 40,02 mg/L ble laget av teofyllin anhydrat (som angitt i kapittel 2.1.5). Fra teofyllinløsningen ble det tatt ut 6 delprøver. Tre delprøver ble filtrert gjennom hvert sitt sprøytefilter (CA, 0,22  $\mu\text{m}$  porestørrelse), med samme metode som beskrevet for filtrering av standardløsninger (se kapittel 2.1.5) og tre delprøver ble direkte overført til HPLC-prøvebeholder (ufiltrert). Alle prøvene ble analysert i HPLC med gradient elueringsmetode, med henholdsvis 3 målereplikater av hver filtrert prøve og 2 målereplikater av hver ufiltrert prøve. Arealene mellom filtrerte og ufiltrerte prøver ble deretter sammenlignet.

## *Filtertest 2*

### Metodebeskrivelse

En standardløsning med teofyllinkonsentrasjon 1 mg/L ble laget av teofyllin anhydrat (som angitt i kapittel 2.1.5). En 5-ml målesprøyte ble fullstendig fylt med teofyllinløsning (~6 mL) og påsatt sprøytefilter (CA, 0,22 µm porestørrelse). Hver 1 mL fraksjon av filtratet ble overført til hver sin merkede HPLC-prøvebeholdere (i alt 6 prøvebeholdere). En ufiltrert delprøve ble også hentet fra teofyllinløsningen overført til HPLC-prøvebeholder.

Avslutningsvis ble en ny 5-mL målesprøyte fylt med rensset vann og påsatt samme sprøytefilter som tidligere var blitt brukt til å filtrere de ~6 mL av teofyllinløsning. De fire første mL av filtrert vann ble forkastet før 1 mL filtrat ble overført til HPLC-prøvebeholder. Prøvene ble analysert i HPLC med gradient elueringsmetode, tre målereplikater av hver prøve, unntatt prøven med filtrert vann. Denne prøven ble kun analysert 1 gang. Prøven med filtrert vann ble analysert først, deretter filtrerte prøver fra første 1 mL fraksjon til siste 1 mL fraksjon av filtrat, og ufiltrert prøve ble analysert sist.

## 4. Resultater

### 4.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent

#### 4.1.1 Kartlegging av bølgelengde for maksimal UV-absorbans for teofyllin

Maksimal absorpsjon av UV-lys ble funnet ved bølgelengde på 271,5 nm for standardløsning [20 mg/L] og ved bølgelengde 271,6 nm for standardløsning [5 mg/L] teofyllin.

#### 4.1.2 Isokratisk elueringsmetode: Deteksjon av teofyllin og kartlegging av mobilfasesammensetting

Det ble påvist signal (topp) for teofyllin i alle kromatogrammene til forsøkene med isokratisk eluering. Toppen i kromatogrammet viste best symmetri når prøvene ble analysert med mobilfasesammensetning 80% vann og 20 % metanol og mobilfasesammensetning 90% vann og 10% metanol. Ved videre forbedring av elueringsmetoden gav mobilfasesammensetningen 83:17 (vann:metanol) og mobilfasesammensetningen 80:20 (vann:metanol) topp med god symmetri (symmetrifaktor  $> 0.9$ , men  $< 1$ ). Analysen med mobilfasesammensetning 83:17 (vann:metanol) gav topp med best symmetri. Retensjonstiden for teofyllin var her 2,58 minutter. Ingen forurensende topper ble detektert i kromatogrammet fra analysen med 20 minutters varighet.

#### 4.1.3 Undersøkelse av linearitet (håndteringsanalyse 1)

Signal for teofyllin ble påvist i alle kromatogrammene fra serien med standardløsninger. Beregningene viste en lineær regresjonskurve og  $R^2 = 1$ . Gjennomsnittlig retensjonstid for de fire standardløsningene som ble analysert i håndteringsanalyse 1 var 2,47 minutter (%RSD = 0,2).

#### 4.1.4 Håndteringsanalyse 2: Undersøkelse av linearitet, forsøk repetert

I håndteringsanalyse 2 fant man ikke et proporsjonalt forhold mellom konsentrasjon til standardløsninger og areal. Forsøket greide ikke å reproducere resultatene fra håndteringsanalyse 1. I kromatogrammene fra standardløsningene med konsentrasjoner 2 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L viste alle to topper. Ingen av toppene hadde samme retensjonstid som teofyllin fra håndteringsforsøk 1 (2,47 minutter  $\pm$  0,2%). Håndteringsanalyse 2 gav topper med både kortere og lengre retensjonstid (1,236 minutter  $\pm$  1,95% og 4,95 minutter  $\pm$

0,39%) enn håndteringsanalyse 1. Signalintensiteten (høyden til toppen) var også lavere i alle kromatogrammene enn ved håndteringsanalyse 1.

Det ble registrert økt trykk fra HPLC («back pressure») under denne håndteringsanalysen. Trykket var også høyere enn tidligere når metanol ble kjørt gjennom HPLC-systemet etter endt analyse.

## 4.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4

### 4.2.1 Utprøving av ny HPLC-kolonne og gradient elueringsmetode

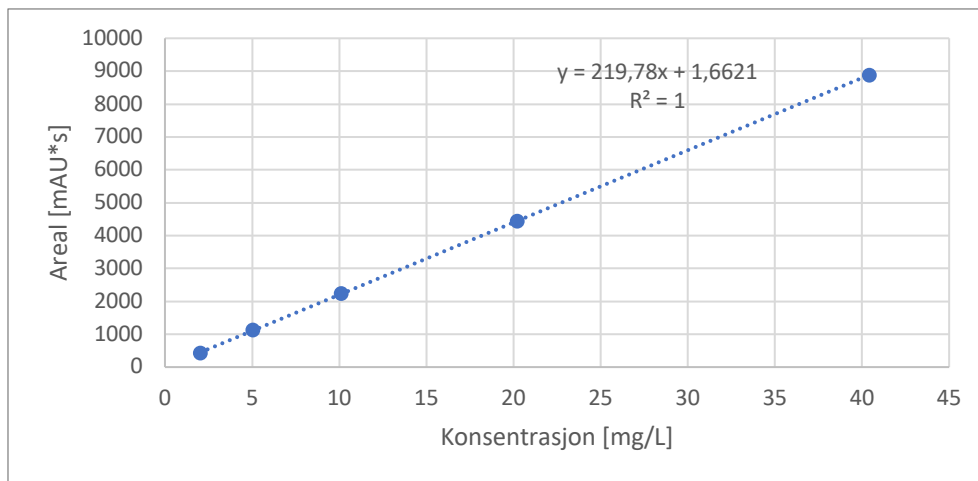
Signal for teofyllin ble påvist i alle kromatogrammene fra prøvene med rent teofyllin og prøvene med teofyllin fra depottablett. Toppene var smale og viste god symmetri. Tabell 7 viser areal, høyde og retensjonstid fra disse analysene. Gjennomsnittlig retensjonstid for prøvene med injeksjonsvolum 50  $\mu\text{L}$  var 7,11 minutter ( $\pm 0,544$  % RSD,  $n=5$ , beregnet fra resultater til prøvene med løsning fra teofyllin anhydrat og fra Theo-Dur® depottablett). Analyseresultatene fra teofyllinløsning av depottablett viste at gjennomsnittsarealet til prøvene fra depottablett var 3611,9  $\text{mAU}\cdot\text{s}$  ( $\pm 4,349\%$  RSD,  $n = 3$ , injeksjonsvolum 50  $\mu\text{L}$ ). Verdiene i tabellen viser at det var relativt små variasjonene i areal, retensjonstid og høyde mellom prøvereplikatene (ved injeksjonsvolum 50  $\mu\text{L}$ ). En økning i injeksjonsvolum med 80% for prøvene med teofyllin fra depottablett (fra 30 $\mu\text{L}$  til 50  $\mu\text{L}$ ) og med 40% for prøvene med teofyllin anhydrat (fra 10  $\mu\text{L}$  til 50  $\mu\text{L}$ ) viste tilnærmet lik økning i toppareal (80% og 39%).

**Tabell 7:** Resultater fra første analyser med gradient mobilfasesammensetting.

Prøve analysert	Injeksjonsvolum [ $\mu\text{L}$ ]	Høyde [mAU]	Areal [mAU*s]	Retensjonstid [min]
[20 mg/L] opløsning fra teofyllin anhydrat	10	136.92827	752.77100	7.064
	50	684.92322	3765.82202	7.105
	50	669.63953	3730.20337	7.175
Teofyllinopløsning fra Theo-Dur® depottablett	30	402.29892	2203.94507	7.078
	50	611.84192	3432.01733	7.105
	50	653.38507	3681.49512	7.103
	50	646.81744	3722.10303	7.069

#### 4.2.2 Etablering av lineært måleområde og kalibrering av HPLC

For kalibrering av HPLC ble standardserier med konsentrasjonene 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L og 40 mg/L ( $\pm 1\%$ ) vurdert å gi regresjonslinjene med best korrelasjon mellom areal og teofyllinkonsentrasjon. Det relative standardavviket for samtlige av prøvenes tre målereplikater viste at variasjonen var liten (alle  $RSD \leq 1\%$ ). Regresjonskurven er vist i figur 14.



**Figur 14:** Regresjonskurve fra HPLC-analysen av en serie standardløsninger med 5 ulike teofyllinkonsentrasjoner (2,02 mg/L, 5,05 mg/L, 10,1 mg/L, 20,2 mg/L og 40,4 mg/L). Figuren viser et direkte proporsjonalt forhold mellom konsentrasjon av teofyllin og areal fra HPLC med UV-deteksjon. Regresjonsligningen og regresjonskoeffisienten er angitt øverst i figuren.

#### 4.2.3 Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett

Resultatene fra forsøket fra kartlegging av arealene med FST med Theo-Dur® depottabletter som var manipulert i ulik grad er vist i tabell 8 og presentert som største og minste areal målt i hver av FST (prøvene som ble samlet inn gjennom 18 tidsintervaller). Fra tabellen ser man at arealene oversiger det lineære måleområdet til kalibreringssystemet. For hele og delte depottabletter ligger de laveste arealene i tabellen i øverste konsentrasjonsområde til kalibreringssystemet

Oppløsningstest av finknust depottablett i tablettcelle viste seg å være problematisk, ettersom prøveoppsamlingen opphørte i løpet av testens tidsintervall nummer 2. Dette forårsaket manglende prøvevolum for resterende tidsintervaller. For alle de gjennomførte FST ble det observert variable prøvevolumer for hver test sine 18 prøver. Innstillingen for prøvevolumet i

programvaren (disso.NET) var 20 mL. Det ble valgt å registrere prøvevolum til flere av forsøkene, fordi årsaken bak og betydningen denne variasjonen hadde for senere beregninger av teofyllinkonsentrasjon i prøvene var ukjent på dette tidspunktet.

**Tabell 8:** Største og minste areal målt i prøvene fra FST i apparat 4 (tablettcelle).

Kartlegging av areal til prøver fra oppløsningstester		
Depottablett testet	Areal [mAU*s]	
	Minste	Største
Hel	6689,8	14122,3
Hel, FST repetert	7931,0	17413,4
Delt	8672,9	17113,8
Knust forsiktig <sup>(a)</sup>	1244,8	42522,7
Knust; homogen pulverblanding*	35288,1	44881,4

<sup>(a)</sup> Pellets forsøkt bevart

\*Tablettcelle gikk tett underveis i fraksjonssamling av prøve nr. 2, og derfor ble kun prøvemateriale fra de første to intervallene tilgjengelig for analyse.

#### 4.2.4 Frisettingstester i apparat 4, av hel og delt depottablett med fortytning av prøvene

Minste og største areal til hver runde med FST av delte og hele depottabletter er presentert i tabell 9 (fullstendig oversikt over alle prøvenes arealer er gitt i appendiks 5). Prøvene som ble fortynt med faktor 2,5 (FST delt depottablett) viste arealer utenfor kalibreringskurvens øverste konsentrasjonsområde.

Alle prøvene som ble fortynt med faktor 4 (FST hel og delt depottablett) hadde arealer innenfor konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven.

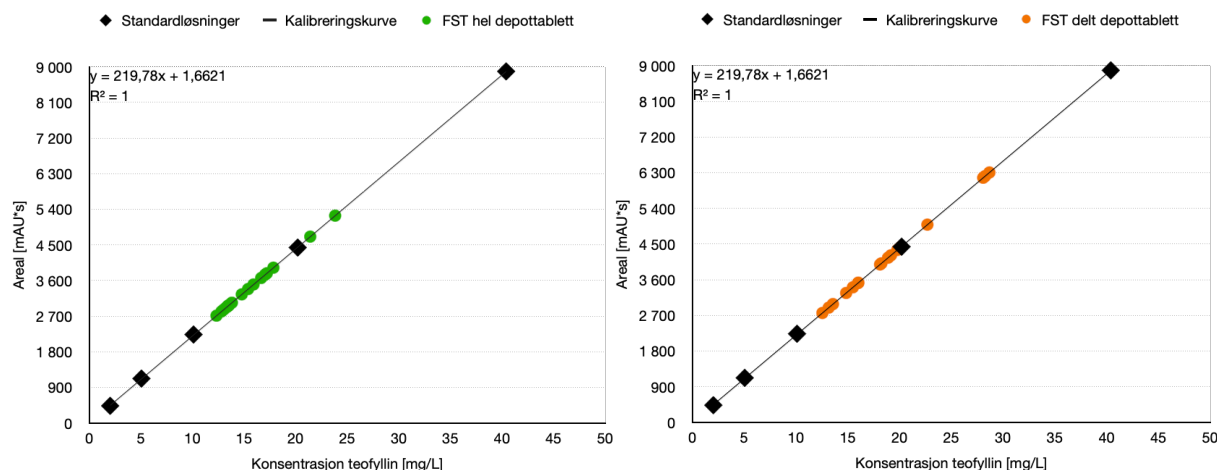
Figur 15 viser relasjonen mellom arealet til prøvene som ble fortynt med faktor 4 før HPLC-analysen og konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven.

Det ble observert betydelig avvik mellom innstilt prøvevolum og volum til mange av prøvene i alle tre rundene med FST. Denne informasjonen ble videreformidlet til innehaveren av prosjektet.

**Tabell 9:** Største og minste areal målt i fortyntede prøver etter FST i apparat 4 for hele og delte Theodor® depottabletter. Utfyllende informasjon om areal i prøver fra samtlige tidsintervaller er gitt i appendiks 5

Kartlegging av areal til prøver fra hel og delt depottablett med fortytning	
---	--

Manipulasjon depottablett	Fortynningsfaktor	Areal	
		Minste	Største
Delt	2,5	4510,3	10693,0
Delt	4	2759,5	6304,8
Hel	4	2710,4	5238,1



**Figur 15:** Viser måleområde til prøver fra FST av hele og delte depottabletter (grønne og oransje punkter) i forhold til kalibreringskurvens konsentrasjonsområde (sorte punkter).

#### 4.2.5 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle

Etter at tablettcellen ble erstattet av granulat- og pulvercelle ble det samlet opp prøver under alle tidsintervallene så lenge testen pågikk. Det ble observert at pulverpartikler fløt opp mot cellehodet i FTC, men det oppsto ingen problemer med totalt opphør av prøveoppsamlingen under testen. I likhet med FST i kapittel 4.2.3, ble det også her målt betydelig avvik mellom innstilt prøvevolum og volum til mange av prøvene fra testen.

Resultatene fra HPLC-analysen viste at flere av prøvene fra de første tidsintervallene hadde svært høye arealer sammenlignet med kalibreringskurvens rekkevidde for konsentrasjon. Det var en relativt rask nedgang i arealstørrelse og arealet målt i prøven fra det femte tidsintervallet lå innenfor den aktuelle kalibreringskurvens rekkevidde. Minste og største areal målt i HPLC fra prøvene var henholdsvis 406,0 mAU\*s og 50889,8 mAU\*s (se appendiks 5 for alle prøvearealene).

#### 4.2.6 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortynning av prøver

Minste og største areal målt i HPLC fra prøvene var henholdsvis 201,8 mAu\*s og 24505,2 mAU\*s. Prøven med største målte areal var fortynnet med faktor 10 før HPLC-analysen. Fortynningsprosedyren som ble forsøkt i dette forsøket var ikke tilstrekkelig for å oppnå resultater innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde.

### 4.3 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4

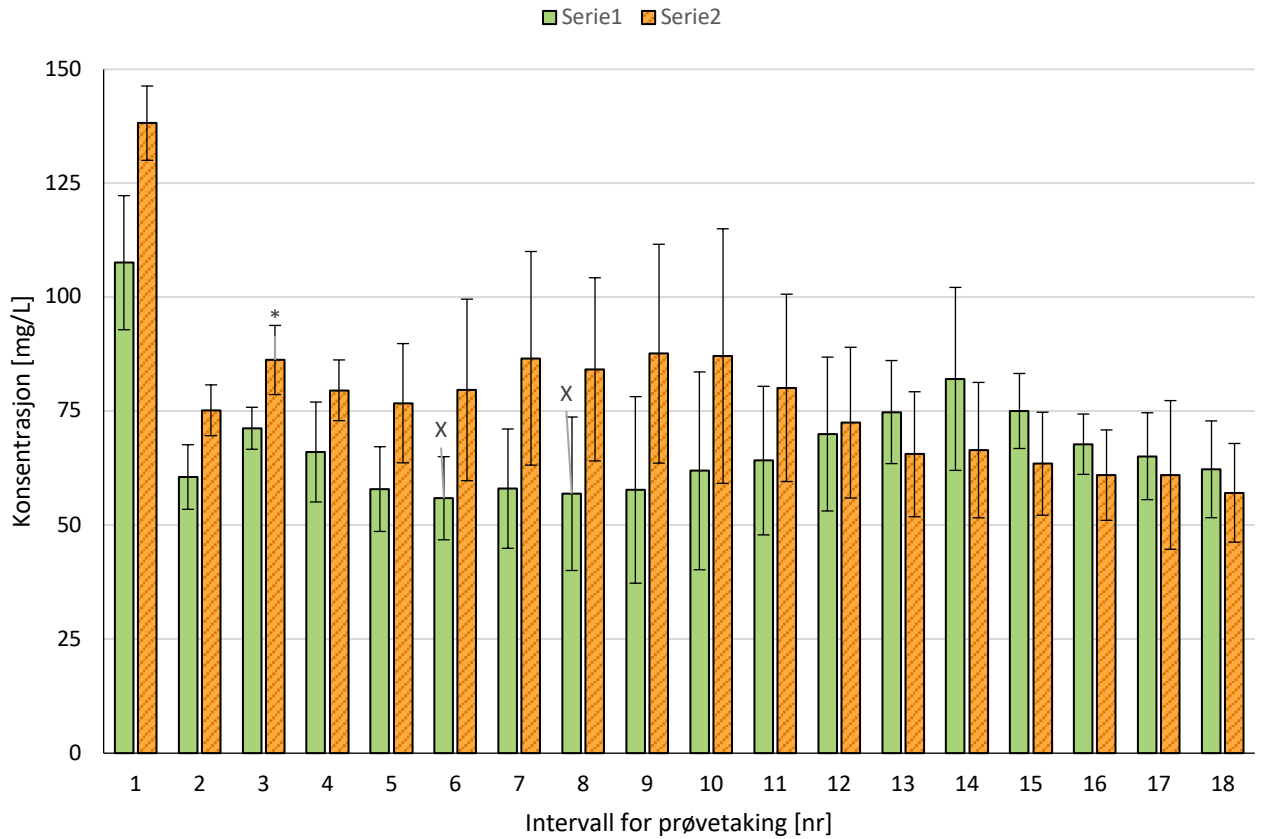
#### 4.3.1 Triplett frisettingstest av hele og delte depottabletter

##### *Test H1, H2, D1 og D2: Tablettcelle*

Figur 16 presenterer den gjennomsnittlige konsentrasjonen av teofyllin som ble målt i prøvene etter FST med hele depottabletter (test H1 og test H2) og delte depottabletter (test D1 og test D2). Ifølge figur 16 blir teofyllin frisatt ganske jevnt over tid, innenfor visse variasjoner (vist med feilstolper i diagrammet). Unntaket er prøve nummer 1, som har langt høyere konsentrasjon sammenlignet med det som er funnet i de øvrige prøvene. Tilsvarende trend ble også funnet i tidligere FST av hel og delt depottablett (se appendiks 5), der testenenes første prøve har større areal enn resten av prøvene.

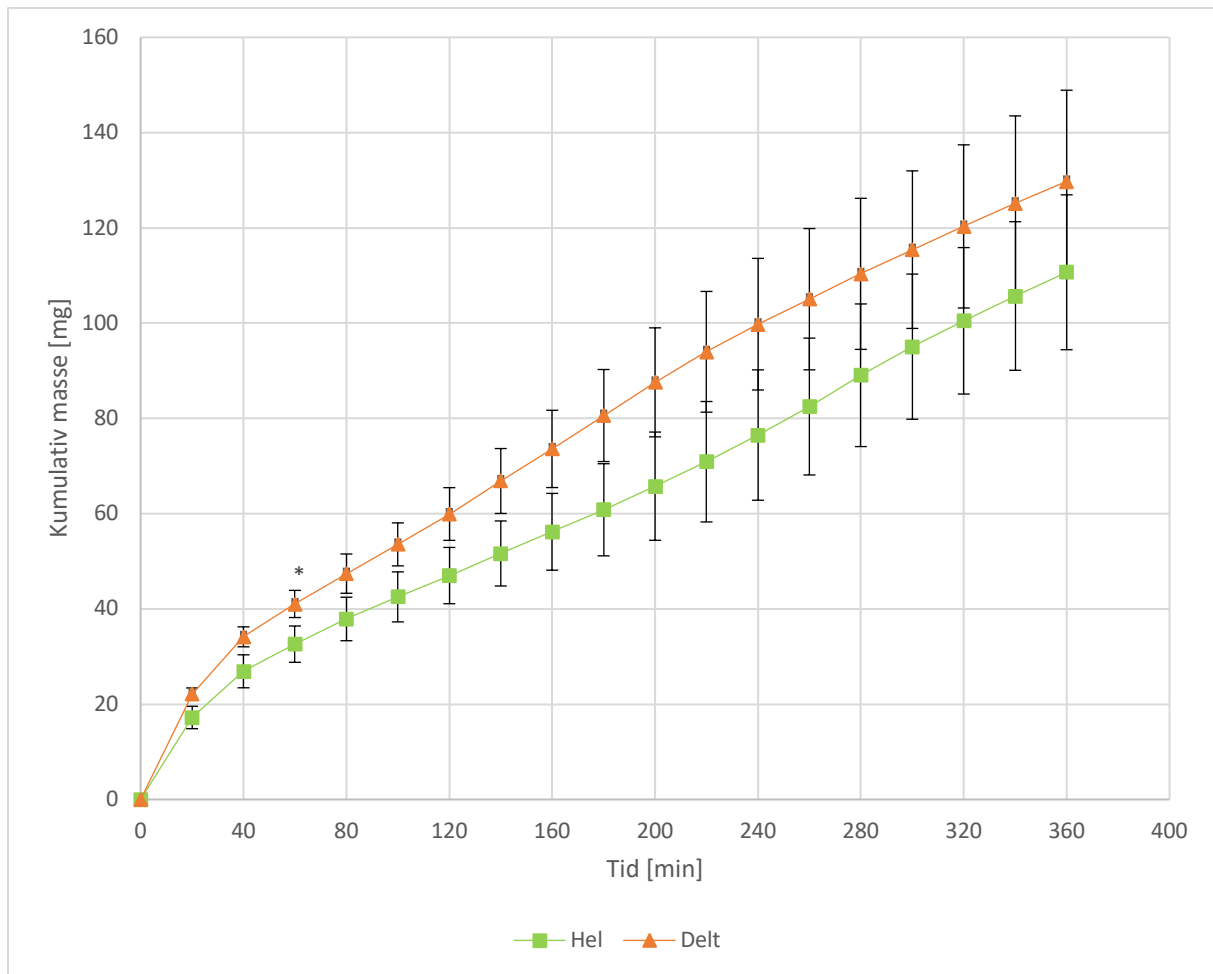
Frem til prøve nr. 12, ser det ut som frisettingsrate av teofyllin er større fra delte depottabletter sammenlignet med hele. Etter prøve nr. 12 snur trenden og frisettingsraten ser ut til å bli noe større for hele depottabletter. Standardavvik til data for konsentrasjon viser tendens til stor spredning i resultatene. Dette indikerer at det er liten sannsynlighet for at det som kan se ut som en trend i forskjell i frisettingsrate mellom hele og delte depottabletter sannsynligvis ikke er signifikante forskjeller. Unntaket er konsentrasjonen i prøvene fra de tre første tidsintervallene. Her er det ikke overlapp i standardavvik og sannsynligheten er større for at en signifikant forskjell i konsentrasjon mellom hele og delte kan påvises. Sannsynligheten for en signifikant forskjell i konsentrasjon ut til å være størst for prøvene i testens første tidsintervall, ifølge figur 16.





**Figur 16:** Gjennomsnittlig teofyllinkonsentrasjon målt i prøvene ( $\pm$  SD, n=6, for søyle markert med stjerne (\*) n= 5) etter FST (i tripler) av hele og delte Theo-Dur® depottabletter (test H1, H2 og test D1 og D2). De grønne stolpene viser konsentrasjonen i prøvene fra hele depottabletter og de oransjeskraverte stolpene viser konsentrasjonen i prøvene fra delte depottabletter. Prøve nr. 6 og nr. 8 for hele depottabletter er markert med X da resultatene viste signifikant forskjell fra normalfordeling i resultatene (p=0,0440 for prøve nr. 6 og p=0,0087).

Figur 17 viser en kumulativ frisettingsprofil; gjennomsnittlig masse (mg) av teofyllin som frisettes under FST.



**Figur 17:** Gjennomsnittlig kumulativ frisetting av teofyllin [mg] fra FST ( $\pm$  SD, n=6, datapunktet markert med stjerne har n= 5) med hele og delte Theo-Dur® depottabletter (300 mg styrke) fra test H1 og H2 og test D1 og D2.

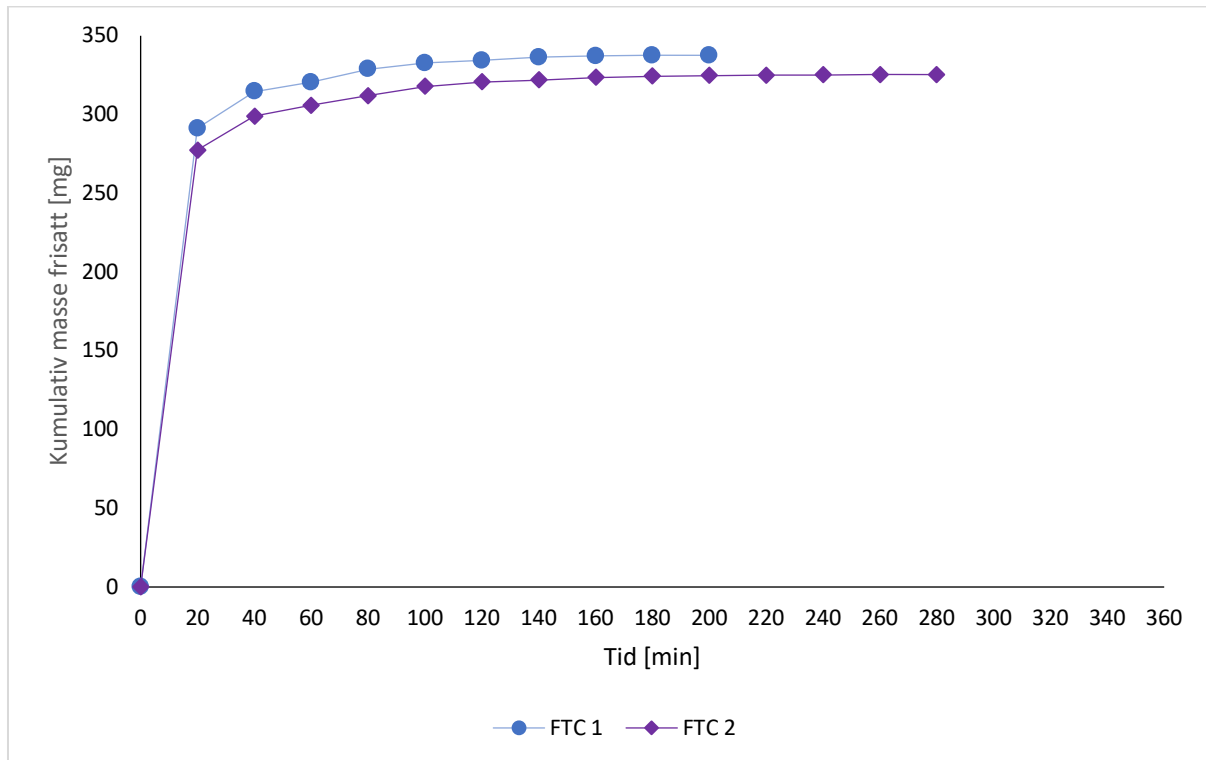
Det ble registrert flere større avvik ( $> 10\%$ ) mellom innstilt volum og volumet som ble målt i prøvene etter FST. For noen av gjennomstrømningscellene skjer en betraktelig reduksjon i oppsamlet prøvevolum når gjennomstrømningshastigheten i testen reduseres (til 4 ml/min fra 8 ml/min).

#### 4.3.2 Triplett frisettingstest av knuste depottabletter

##### *Test K1: Originalt oppsett av granulat -og pulvercelle*

I første del av dette forsøket gikk FTC 3 tett, derfor ble det kun oppsamlet prøver fra FTC 1 og FTC 2. Arealene til prøvene fra tidsintervall 1–10 hos FTC 1 lå innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde. Prøvene fra tidsintervall 11-18 viste mindre arealer enn kalibreringskurvens område. For FTC 2 lå prøvene fra tidsintervall 1-14 innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde, og prøvene fra tidsintervall 15 – 18 viste mindre

arealer enn kalibreringskurvens område. Figur 18 viser den kumulative massen av teofyllin som ble frisatt per tid for FTC 1 og FTC2. Grafene viser at størsteparten av depottablettens innholdsdeklarererte mengde teofyllin blir frisatt umiddelbart, i løpet av testens første 20 minutter.



**Figur 18:** Kumulativ masse frisatt ved oppløsningstester (triplett) av knuste Theo-Dur® depottablett i granulat -og pulvercelle, originalt oppsett (test K1). Masse til teofyllin ble kun beregnet for prøvene som hadde arealer innenfor kalibreringskurvens rekkevidde. FTC 3 gikk tett i starten av testen, og ingen prøver ble derfor samlet fra denne gjennomstrømningscellen.

### *Test K2 og K3: Revidert oppsett av granulat -og pulvercelle*

Hensikten med test K2 var å undersøke om det var mulig å forhindre uønsket forflytning og velt av metallsikten i granulat -og pulvercellen under FST av knust depottablett. Ingen av gjennomstrømningscellene gikk tett i forsøk K2, mens både FTC 2 og FTC 3 gikk tett underveis i test K3. Resultatene fra arealene målt i prøvene fra hvert tidsintervall i test K2 og K3 er vist i tabell 10.

**Tabell 10:** Areal [mAu\*s] målt i prøvene fra hvert tidsintervall i test K2 og test K3. Markert rute viser areal over (oransje) eller under (blå) den tilhørende kalibreringskurvens konsentrasjonsområde, med utgangspunkt i ICH sine retningslinjer om at kalibreringskurve bør dekke 80-120 % av prøvenes måleområde (86).

K2	<i>Fortynningsfaktor</i>																		Areal [mAU*s]
	50	20	4	2	1														
Prøve [nr]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
FTC 1	4020	2509	4019	5338	7486	6824	5172	5500	5008	4972	5160	7161	9282	5284	5316	3571	3140	2586	
FTC 2	5401	1462	2276	3209	6038	9303	6896	2798	1599	1102	1091	359	218	81,0	42,8	33,8	19,8	13,5	
FTC 3	5022	1443	3472	5398	8975	7866	6831	5943	12761	4327	2847	2804	2307	1548	1932	2477	2014	1621	

K3	<i>Fortynningsfaktor</i>																		Areal [mAU*s]
	50	20	4								2		1						
Prøve [nr]	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
FTC 1	6637	596	148	56,9	32,6	26,4	10,8	10,0	9,04	8,19	13,6	15,4	FTC tett						
FTC 2	6189	1008	242	72,6	32,6	19,6	16,1	14,5	11,0	10,4	23,7	25,4	31,2	25,3	FTC tett				
FTC 3	5310	1201	3893	2236	1655	1844	1486	985	759	648	1270	1531	2370	1795	1178	1147	839	765	

## 4.4 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode

### 4.4.1 Undersøkelse av stabilitet til løsninger med teofyllin

Stabilitet til teofyllin oppløst i vann ble undersøkt eksperimentelt til to løsninger med teofyllin (av teofyllin anhydrat og teofyllin fra knuste depottabletter). Hensikten var å sjekke tegn til nedbrytning/endring i teofyllinkonsentrasjonen i løsningene over tid (fra FST start til ferdig analyserte prøver i HPLC). Resultatene er vist i tabell 11 og tabell 12. Analysen viser at arealet til prøvene fra begge løsningene holder seg relativt stabilt over 48 timer og minimalt avvik mellom arealet til prøvene og referanseprøvens areal.

Relativt standardavvik viste at variasjonene mellom målereplikatene til hver prøve (n = 3) og mellom prøvene (n = 3 målereplikater x 5 prøver og n = 3 målereplikater x 3 prøver) var små.

**Tabell 11:** Resultatene fra stabilitetsundersøkelsen med en løsning av teofyllin anhydrat (konsentrasjon tilsvarende 20 mg/L  $\geq 99$  % teofyllin). Tabellen viser prøvenes oppbevaringstid i vannbad ( $v/37^{\circ}\text{C}$ ), gjennomsnittsareal, relativt standardavvik og avvik mellom prøvene og referanse (tidspunkt 0 timer).

Tid i vannbad [timer]	Areal gjennomsnitt [mAU*s]	%RSD [prosent]	Recovery [prosent]
0	3389,25	0,269	100
4	3379,14	0,104	99,7
7	3388,74	0,177	100,0
24	3395,24	0,319	100,2
48	3385,64	0,307	99,9
<b>Alle målereplikater og prøver (n= 15)</b>	3387,6	0,265	-

**Tabell 12:** Resultatene fra stabilitetsundersøkelsen med en løsning av teofyllin fra knuste depottabletter. Tabellen viser prøvenes oppbevaringstid i vannbad ( $v/37^{\circ}\text{C}$ ), gjennomsnittsareal, relativt standardavvik og avvik mellom prøvene og referanse (tidspunkt 0 timer).

Tid i vannbad [timer]	Areal gjennomsnitt [mAU*s]	%RSD [prosent]	Recovery [prosent]
0	2137,07	0,288	100
24	2137,78	0,068	100,0
48	2149,94	0,075	100,6
<b>Alle målereplikater og prøver (n= 9)</b>	2141,64	0,330	

#### 4.4.2 Recovery-forsøk: Evaluering av analysemetodens nøyaktighet

Gjenfunnet (recovery) referansestandard i prøver fra teofyllinløsninger av knuste depottabletter tilsatt en kjent mengde teofyllin anhydrat, ble utført for å evaluere nøyaktigheten til analysemetoden (HPLC med gradient eluering). Resultatene er presentert i tabell 13.

**Tabell 13:** Resultatene fra gjenfunnet teofyllin referansestandard (recovery) ved HPLC analyse.

Mengde pulverblanding fra knust depottablett [mg]	Mengde av referansestandard [mg]	Tillaging av løsning, runde [nr]	Referansestandard gjenfunnet [mg] ( <i>n</i> = 3 målereplikater)	Recovery [prosent] ( <i>n</i> = 3 målereplikater)	Recovery, gjennomsnitt [prosent] ( <i>n</i> = 9)
50 mg	23,5	1	23,38	99,5	
		2	22,47	95,6	99,5
		3	24,32	103,5	

Gjennomsnittlig recovery av tilsatt referansestandard (teofyllin anhydrat) i de tre løsningene som ble analysert var 99,5%, og spredningen i resultatene oppgitt som relativt standardavvik ble beregnet å være 3,969%

#### 4.4.3 Bestemmelse av mengde teofyllin i Theo-Dur® Depottabletter i HPLC-UV

Resultatene fra denne undersøkelsen er presentert i tabell 14. Tabellen viser variasjonen i bestemmelse av mengde (mg) teofyllin ved HPLC-analyse med gradient eluering, fra tre målereplikater (for dag 1) og tre prøvereplikater (for dag 2 og 3) som gjennomsnitt ± standardavvik. Interdag-variasjonen for bestemmelse av masse teofyllin er i tabellen angitt som relativt standardavvik. Recovery ble beregnet ut fra de 300 mg deklarerert innhold av teofyllin i Theo-Dur depottabletter og recovery er oppgitt som prosent.

**Tabell 14:** Variasjon i bestemmelse av mengde (mg) teofyllin i Theo-Dur® 300 mg depottabletter undersøkt på tre ulike dager. Dag 1 er markert med stjerne fordi gjennomsnittsmassen og standardavviket er beregnet fra 3 målereplikater av samme prøve. For dag 2 og 3 er beregningene basert på analyse av 3 prøvereplikater (teofyllinløsning av knuste depottabletter), 3 målereplikater av hver prøve.

	Gjenfunnet mengde teofyllin i prøvene $\pm$ SD		% RSD, recovery (alle 3 dager) [prosent]
	[mg]	[Prosent recovery]	
Dag 1*	320,5 mg $\pm$ 6,43 mg (RSD: 2,01%)	106,7 % $\pm$ 2,14 %	5,39 %
Dag 2	293,5 mg $\pm$ 13,23 mg (RSD: 4,51 %)	97,8 % $\pm$ 4,41 %	
Dag 3	293,4 mg $\pm$ 10,59 (RSD: 3,61%)	97,81% $\pm$ 3,53 %	

#### 4.4.4 Undersøkelse av sprøytefiltrering

##### *Filtertest 1*

I dette forsøket ble areal fra teofyllinoppløsning [40,2 mg/L] som var filtrert (der 4 første mL filtrat ble forkastet) sammenlignet med areal fra ufiltrert andel fra samme teofyllinoppløsning [40,2 mg/L]. Resultatene er presentert i tabell 15 og viser at differansen mellom gjennomsnittsårealet til filtrerte og ufiltrerte prøver er liten. Analysen viste at filtrerte prøver hadde et noe lavere gjennomsnittsåreal (-0,123%) enn ufiltrerte. Videre ble relativt standardavvik større for ufiltrerte prøver og indikerer at det er mer variasjon i prøvene når de ikke filtreres.

**Tabell 15:** Viser sammenligning av gjennomsnittsåreal mellom filtrert og ufiltrert løsning av teofyllin [40,2 mg/L]. Gjennomsnitt åreal målt i HPLC av tre filtrerte løsninger (3 målereplikater av hver) og tre ufiltrerte løsninger (to målereplikater av hver). Variasjon i areal er vist som standardavvik og relativt standardavvik (RSD).

	Areal gjennomsnitt [mAu*s]	Standardavvik [mAu*s]	RSD [prosent]	% Differanse (vs. ufiltrert) [prosent]
Filtrert	6691,34	43,06	0,644	-0,123
Ufiltrert	6699,58	106,02	1,583	N/A

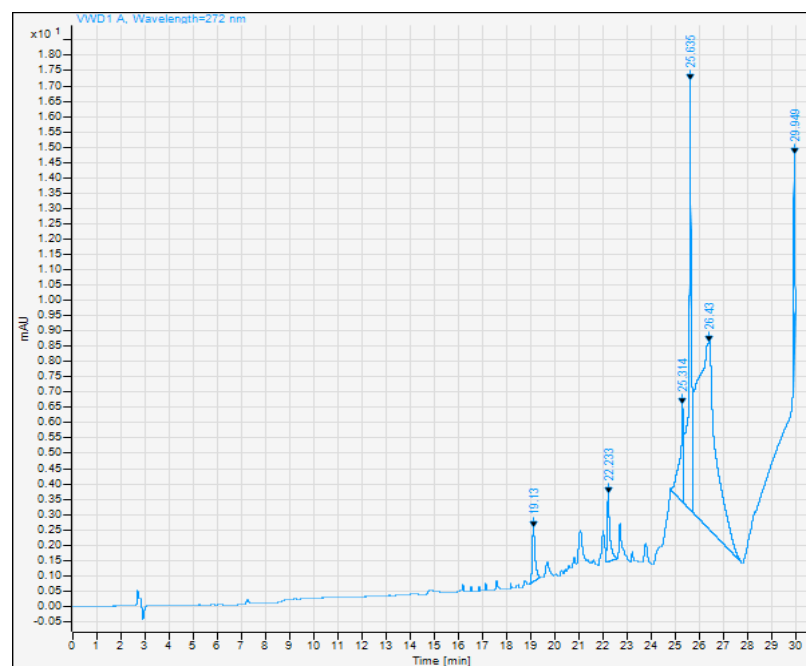
##### *Filtertest 2*

I dette forsøket ble ~6 mL teofyllinløsning [1 mg/L] filtrert gjennom et sprøytefilter og 1 mL av hver fraksjon filtrat ble analysert i HPLC. Resultatene er presentert i tabell 16 og viser lavere areal for ufiltrert teofyllinløsning sammenlignet med analysene av filtrat nr 1-5. Filtrat

nr 6 ligger nærmere ufiltrert teofyllinløsning i areal sammenlignet med de foregående filtratene. Tegn på overføringseffekt fra filteret ble videre undersøkt ved å filtrere vann og resultatet er vist som kromatogram i figur 19. En svak antydning til forhøyning i kromatogrammets grunnlinje for retensjonstiden til teofyllin kan sees. Signalintensiteten var for svak til at det ble registrert som en topp i HPLC-maskinens programvare (Agilent ChemStation).

**Tabell 16:** Viser gjennomsnittlig areal, standardavvik og relativt standardavvik beregnet fra hver prøves 3 målereplikate, samt differansen mellom den filtrerte fraksjonen og ufiltrert løsning av teofyllin.

mL filtrat [nr]	Areal gjennomsnitt [mAU*s]	Standardavvik [mAU*s]	% RSD [prosent]	% Differanse (vs. Ufiltrert)
<b>Ufiltrert</b>	193,711	0,237	0,122	N/A
<b>1</b>	238,506	2,536	1,063	23,12
<b>2</b>	248,993	0,769	0,309	23,12
<b>3</b>	233,087	0,408	0,175	20,33
<b>4</b>	243,206	0,375	0,154	25,55
<b>5</b>	234,767	0,459	0,196	21,19
<b>6</b>	197,729	0,403	0,204	2,074





**Figur 19:** Kromatogram fra HPLC-analyse av prøve med rensset vann som er filtrert gjennom sprøytefilter tidligere skylt gjennom med ~6mL standardløsning teofyllin [1 mg/L]. Kromatogrammet viser antydning til forstyrrelse (topp) på grunnlinjen i området for retensjonstid til teofyllin (~7,2 minutter). Signalintensitet var ikke tilstrekkelig til at det ble registrert som topp i kromatogram fra HPLC-programvare.

## 5. Diskusjon

### 5.1 Forsøk, Resultater og vurderinger gjort underveis

#### 5.1.1 Metodeutvikling: HPLC-UV med isokratisk eluent

Som følge av resultatene fra undersøkelse av den maksimale absorpsjonen av UV-lys ( $\lambda_{\max}$ ) for teofyllin, ble det valgt å innstille bølgelengden i UV-detektor til 272 nm i analysemetoden. Bølgelengden for  $\lambda_{\max}$  som ble funnet i vårt forsøk, er i relativt god overensstemmelse med tidligere publiserte verdier og bølgelengder benyttet i andre studier (37,83). Å innstille bølgelengden til 272 nm for HPLC-detektoren vil trolig gi en deteksjonsmetode med god følsomhet (82). Dette ble ansett som en fordel for analysemetoden vi forsøkte å utvikle, fordi det da blir mulig å påvise små forskjeller i teofyllinkonsentrasjon i prøvene fra FST. For eksempel at analysemetoden har tilstrekkelig sensitivitet til å kunne avdekke om endringer av forsøksparametere i FST av depottablett innvirker på frisettingsprofilen av teofyllin.

Det ble valgt å forsøke å utvikle en analysemetode med isokratisk eluering til den analysekolonnen som allerede var koblet til HPLC-apparatet. Bakgrunnen for valget var at metoder med isokratisk eluering kan være enklere å utvikle og enkel i bruk, og metanol ble funnet å være et vanlig førstevalg som organisk løsemiddel ved RP-HPLC (76,78). Ved prosjektstart vart det en begrenset kunnskap og erfaring relatert til instrumentering og metodeutvikling i praksis med RP-HPLC. Dette medførte nok at det litt for sent ble oppdaget ting som kanskje burde vært utført annerledes i metodeutviklingen.

Etter utprøvingen av HPLC-analyse av teofyllin standardløsning med ulike sammensetninger av vann og metanol som isokratisk elueringsmetode, ble det besluttet å forsøke videre metodeutvikling med mobilfasesammensetningen 83% vann og 17% metanol. Kromatogram med mobilfasesammensetning 80% vann og 20% metanol gav høyeste og smaleste topp med ca. et halvt minutt kortere retensjonstid enn mobilfasesammensetning 83:17 (vann:metanol). Symmetrifaktor for toppen var over 0.9 i begge kromammene (men under 1). Sett i ettertid vil en mobilfasesammensetningen med 80:20 (vann:metanol) vært et mer naturlig valg, på grunn av litt kortere retensjonstid, smalere og høyere topp. På tidspunktet denne analysen ble gjennomført ble mobilfasesammensetningen (83:17, vann:metanol) valgt fordi teofyllintoppen i kromatogrammet hadde noe bedre symmetri, samtidig som elueringsmetoden hadde lavere forbruk av organisk løsemiddel. Forskjellen i høyde og bredde til toppen var svært liten sammenlignet med kromatogrammet fra analyse med mobilfasesammensetning 80:20

(vann:metanol). Vurderingen var at dette ikke ville påvirke ytelsen eller kvaliteten til analysemetoden. Å begrense bruk av organisk komponent i mobilfasen opplevdes der og da som et viktig argument, både av miljøhensyn og for å redusere analysekostnadene.

Resultatene fra den første undersøkelsen av linearitet indikerte et direkte proporsjonalt forhold mellom areal og teofyllinkonsentrasjon etter HPLC-analyse av standardløsninger med fire ulike konsentrasjoner (se kapittel 3.1.3 for metodebeskrivelse). Før videre utvikling av et kalibreringssystem med flere konsentrasjonsområder, ønsket vi å utelukke at resultatene fra denne analysen skyldtes tilfeldigheter. Forsøket ble derfor repetert (håndteringsanalyse 2), med uventede stor forskjell mellom analyseresultatene. Det er uklart hvorfor forskjellen i resultatene fra håndteringsanalyse 1 og håndteringsanalyse 2 var så stor. En mulig forklaring kan være at direkte proporsjonalitet i den første analysen var en konsekvens av tilfeldigheter. En annen forklaring kan være at de «dårlige» kromatogrammene i håndteringsanalyse 2 skyldtes tilfeldigheter eller at forurensing/urenheter i HPLC-kolonnen virket forstyrrende på resultatene. Den vanligste årsaken til endringer i ytelse til HPLC oppgis å være forurensninger (74). Enten fra mobilfasen, fra prøvene eller fragmenter som slites løs fra eksempelvis slitte gummipakninger i HPLC-systemet. Forurensning/urenheter ble vurdert som mest sannsynlig årsak fordi dette også kan blokkere for gjennomstrømning av mobilfasen og føre til økt trykk i HPLC-systemet. Kolonner pakket med stasjonærfase av liten partikkelstørrelse er også mer sårbare for å gå tett etter kortere tids bruk enn kolonner med pakkematerial av større diameter (75). Det ble derfor forsøkt å rense HPLC-kolonnen. Hensikten var om mulig å få skylt ut eventuelle urenheter fra kolonnen. En mer detaljert beskrivelse av disse tiltakene, videre forsøk på å utvikle HPLC-metode med isokratisk eluent og diskusjon av disse er beskrevet i appendiks 3.

### 5.1.2 Metodeutvikling: HPLC-UV med gradient eluent og frisettingstester i apparat 4

Som følge av utfordringene som oppsto i forbindelse med utvikling av en analysemetode i HPLC med isokratisk eluent, ble det besluttet å gå over til gradient elueringsmetode. Fra pKa-verdien til teofyllin var det forventet at molekylet hovedsakelig ville være i sin udissoiserte tilstand i pH-området 4 til ~7 (se appendiks 2). Det ble derfor bestemt å først forsøke mobilfaser uten buffer for HPLC-UV-analyse av standardløsninger og prøver.

Hensikten med disse forsøkene var å undersøke hvordan HPLC-metoden med gradient eluering håndterte prøver av teofyllinløsninger både med og uten tablethjelpstoffer, undersøke linearitet og til slutt kalibrere HPLC.

De første utprøvingene av metode med gradient mobilfasesammensetning (se kapittel 4.2.1) viste seg umiddelbart å gi gode resultater med tanke på smale, symmetriske topper, og ingen tegn til at mobilfase uten tilsatt buffer var problematisk for analysen. Dette tyder på at kromatografibetingelsene er egnet for å få samlet teofyllin som et smalt bånd gjennom kolonnen, som er viktig for en nøyaktig kvantifisering av areal til teofyllin i prøvene. (68,70).

Resultatene (presentert i tabell 7) indikerer at metoden gir reproducerbare resultater i forhold til retensjonstid, areal og høyde, samt proporsjonal økning i areal ved økt injeksjonsvolum. Dette gjelder både prøvene med løsning fra teofyllin anhydrat og prøvene med teofyllinløsningen fra Theo-Dur®. Målet med gradient elueringsmetode var i all hovedsak å forebygge oppsamling av forurensninger i HPLC-kolonnen (74,78). For eksempel at svært upolare tablethjelpstoffer blir sittende fast i stasjonærfasen og tetter kolonnen. Det ble også implementert en renseprosedyre/utvasking av kolonnen med sterkere løsemidler på slutten av hver analyse. Denne var basert på de tidligere renseprosedyrene som var brukt (se appendiks 3).

Ingen utfordringer med trykkøkning i HPLC ble registrert før, under eller etter analysene til dette forsøket. Dette tolket vi som et tegn på at ny kolonne (ACE) og/eller gradient elueringsmetode fungerte etter intensjonen. Det er vanskelig å fastslå hvilke faktorer som hadde størst betydning, siden mange forebyggende tiltak ble iverksatt samtidig når den gradient elueringsmetode ble tatt i bruk (se appendiks 3). Etter undersøkelser av hvilke kromatografiske betingelser som har vært brukt i andre publiserte studier (se tabell 4 i appendiks 3), tyder det på at kolonnebyttet har vært av vesentlig betydning for å videre unngå utfordringer med HPLC-analysen. Prøvene som ble analysert i disse studiene inneholdt ulike hjelpstoffer fra OFDF, deriblant både upolare polymerer og polare, men store polymerer. I flere av studiene ble det anvendt isokratisk elueringsmetode, og C<sub>18</sub>-HPLC-kolonne med 5 µm partikkelstørrelse på pakkematerialet så ut til å være en vanlig kolonnetype for kromatografisk separasjon og analyse. Ingen av studiene brukte tilsvarende finpartikulær HPLC-kolonne som 2,7µm. Imidlertid tok denne litteraturgjennomgangen for seg kun et fåtall av publiserte studier som eksisterer, men det gav oss likevel en indikasjon på hvilke typer

kolonner og prøveopparbeidelse som kan fungere ved bruk av HPLC til analyser av prøver som inneholder både virkestoffer og hjelpestoffer.

Ulempene med denne analysemetoden var en betydelig lengre analysetid for hver prøve (totalt 35 minutter), med større forbruk av flere helse -og miljøskadelig organiske løsemidler. Det ble likevel valgt å bruke denne elueringsmetoden videre i prosjektet, fordi undersøkelsene viste gode kromatografiresultater (se resultater kapittel 4.2.1) og tidsrammene for progresjon i metodeutviklingen var begrenset. Flere standardserier ble analysert med gradient elueringsmetode for å estimere hvilket konsentrasjonsområde en linearitet mellom teofyllinkonsentrasjon og detektorrespons kunne forventes. I disse forsøkene oppnådde vi en akseptabel regresjonskoeffisient ( $R^2 \geq 0,998$ ) etter analyse av standardserie med 5 ulike konsentrasjoner i området 2 mg/L til 60 mg/L. Analyseresultatene fra standardserier med konsentrasjon 2 mg/L–40 mg/L ( $\pm 1\%$ ) viser noe bedre korrelasjon mellom areal målt i HPLC og teofyllinkonsentrasjon (korrelasjonskoeffisient nærmere 1 og mindre avvik mellom regresjonslinjen og de fem datapunktene). På bakgrunn av dette ble standardserier med dette konsentrasjonsområdet valgt til kalibrering av HPLC i første omgang.

En svakhet med disse forsøkene var at vi ikke var forutseende nok til å teste linearitet til standardserier som inkluderte lavere konsentrasjoner. At dette også burde vært utført fikk vi senere erfare i forsøkene med kartlegging av areal i prøvene fra FST.

### 5.1.3 Frisettingstester i apparat 4 og analyse av prøver i HPLC-UV

Det er nødvendig at teofyllinkonsentrasjonen i prøvene fra FST ligger innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde for å få en pålitelig og nøyaktig konsentrasjonsbestemmelse med HPLC (68,86). Derfor var det viktig å kartlegge areal i prøvene etter FST av hel, delt og knuste Theo-Dur® depottablett. Dette skulle videre brukes til å lage fortynningsprosedyrer slik at prøvekonsentrasjonene var tilpasset kalibreringskurvens konsentrasjonsområde. Kartleggingen av arealet ble utført med en FST for hver av de manipulerte depottablettene, og kun FST med hel depottablett ble repetert ( $n=2$ ). Vi hadde derfor ingen eller svært lite data angående forventet variasjon i areal ved repetering av FST. Det ble likevel valgt å bruke dataene fra disse FST som startpunkt for utvikling av fortynningsprosedyrer, der vi var forberedt på å justere fortynningen underveis i metodeutviklingen som følge av variasjon i resultatene fra FST.

### *Frisettingstester i apparat 4 med tablettcelle; hel, delt og knust depottablett*

For å begynne metodeutvikling av FST med så like forsøksbetingelser som mulig, ble det valgt å bruke identisk oppsett av FTC (tablettcelle) for både hel, delt og knuste depottabletter. Tablettcelle (22,6 mm i diameter) ble valgt fordi den er oppført i Ph. Eur som en av de standardiserte FTC for FST av OFDF i apparat 4 (59).

Som følge av resultatene (arealene) fra disse forsøkene (se kapittel 4.2.3 og tabell 8) så vi at fortytning av prøver er nødvendig for å unngå og få prøver med teofyllinkonsentrasjoner utenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde. For hele og delte depottabletter ble det til slutt valgt å fortynne alle 18 prøvene med fortynningsfaktor 4 og resultatene tyder på at denne fortynningsfaktoren egner seg for å holde prøvekonsentrasjonene innenfor kalibreringskurvenes rekkevidde (86). Fortynningsfaktoren var også hensiktsmessig med tanke på tilgjengelig laboratorieutstyr og praktisk gjennomføring av fortytningen.

Resultatene etter FST av forsiktig knust depottablett og FST depottablett knust til homogen pulverblanding viser svært høye arealer hos prøvene fra de første tidsintervallene av FST. Forskjellen i areal målt i prøven fra første tidsintervall var ikke veldig stor mellom forsiktig knust (42522,7 mAU\*s) og fullstendig pulverisert depottablett (44881,4 mAU\*s). At det ikke var større forskjell i areal var noe uventet basert på vår antagelse om at hver pellet fungerer som et membrankontrollert system og at pelletene ble forsøkt bevart hos forsiktig knust depottablett. Dette kan tyde på at det oppsto skade på filmdrasjeringen til flere av pelletene når depottabletten ble forsiktig knust for å frigjøre pelletene eller en mer sammensatt frisettingsmekanisme enn tidligere antatt. Dersom frisettingshastigheten av teofyllin kontrolleres ved at hver pellet fungerer som et membrankontrollert reservoarsystem, vil en skadet membran kunne påvirke frisettingen fra de berørte pelletene (31–33). FST av forsiktig knust depottablett ble ekskludert fra den videre metodeutviklingen, fordi knusing av depottabletten og samtidig bevare pellets var tidkrevende. Her ble knusingen vurdert som vanskelig å reprodusere, uten at dette ble bekreftet eller avkreftet eksperimentelt.

På grunn av at prøveoppsamlingen stoppet i begynnelsen av tredje tidsintervall i FST av depottablett knust til homogen pulverblanding, fikk vi kun prøver fra de to første tidsintervallene av FST. Forsøket ble repetert, men da fikk vi ingen prøveoppsamling. Problemet skyldtes sannsynligvis at pulverpartikler fløt opp og samlet seg under cellehodet, og tettet igjen utførselsgangen for oppløsningsmedia. Da ble utførselen av oppløsningsmedia

fra FTC blokkert og dette forhindret oppsamling av prøver. Som følge av dette problemet valgte vi å undersøke om dette bedret seg dersom tablettcellen ble erstattet med granulat -og pulvercelle for FST av homogen pulverblanding (se metodekapittel 3.2.5 og resultatkapittel 4.2.5).

#### *Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle*

Resultatet fra denne undersøkelsen viste ingen problemer med totalt opphør i prøveoppsamlingen fra FRC. Derfor ble granulat- og pulvercelle vurdert å være mer egnet for FST med knust depottablett i apparat 4 og det ble det valgt å bruke denne typen FTC i videre forsøk med FST av knust depottablett. Som følge av resultatene fra dette forsøket, ble det planlagt å repetere forsøket, men med fortykning av prøvene. Ettersom det var store forskjeller i areal mellom de første prøvene, ble det valgt å tilpasse fortykningsfaktoren deretter.

#### *Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortykning av prøver*

Årsaken til at granulat -og pulvercelle ikke ble brukt fra starten, var tanken om å ha så like betingelser som mulig i FST for manipulerede og umanipulerede depottabletter. I ettertid ser man at andre tiltak også kunne vært forsøkt, for eksempel endring av gjennomstrømningshastigheten av oppløsningsmedia før bytte av FTC eller forsøkt å forhindre oppdrift av pulverpartikler ved å tilsette flere 1 mm glasskuler over knust depottablett.

Når vi gjentok FST med knust depottablett i pulver -og granulatcelle undersøkte, men med fortykning av prøvene (se resultatkapittel 4.2.6), ble det målt et overraskende høyt areal (24505,2 mAU\*s) i prøven fra det første tidsintervallet. Flere mulige årsaker til dette ble drøftet:

- At oppløsningshastigheten til knust depottablett vil ha større variasjon som følge av en ikke-standardisert knusingsprosess (knust i morter) (9).
- Variasjon i overført masse av knust depottablett.
- At små fragmenter fra depottabletten med uoppløst virkestoff blir med ved uttak av delprøve og løses opp før eller under filtrering av prøven (før analyse i HPLC) (53) .

Ettersom flere av prøvene hadde både større og mindre arealer enn konsentrasjonsområdet til kalibreringskurven, ble det videre forsøkt med nye tilpasninger av fortynningsfaktorene, samt utvidelse av kalibreringskurvens konsentrasjonsområde til 1 mg/L – 40 mg/L ( $\pm 1\%$ ) med målsetting om å inkludere prøvene med laveste teofyllinkonsentrasjoner.

Opprinnelig var det planlagt å repetere FST med knust depottablett med en ny justering av fortynningsprosedyren. På grunn av tidsbegrensninger ble det derimot valgt å undersøke dette med FST i tripler. Hensikten var å både undersøke om ny fortynningsprosedyre fungerte, og samtidig undersøke variasjonen i resultatene med denne metoden. Det ble derfor planlagt FST i 3 paralleller av 3 knuste depottabletter.

I likhet med øvrige FST ble det også i dette forsøket målt betydelig avvik mellom innstilt prøvevolum og volum til flere av prøvene fra testen. Nærmere undersøkelser av dette og tiltak er beskrevet i appendiks 6.

#### 5.1.4 Repeterbarhet til frisettingstest i apparat 4

Ettersom FST med en depottablett av gangen var tidkrevende, ble det valgt å gjøre videre FST i tre paralleller, med tre FTC tilkoblet forsyning av oppløsningsmedia. Slik kunne FST gjennomføres for tre depottabletter per forsøk (én depot-tablett i hver FTC).

Hensikten med disse forsøkene var å skaffe mer data for å undersøke variasjonen i resultatene (presisjonen) fra FST hos hele, delte og knust depottabletter.

Vi ønsket å undersøke presisjon nærmere fordi det gir informasjon om usikkerheten (tilfeldige feil) til resultatene fra FST. Stor variasjon i prøveresultatene gjør det eksempelvis vanskelig å påvise trender i frisettingsprofilene (61). Dette kan for eksempel tenkes å ha betydning dersom man skal fastslå hvilke matematiske modeller som best beskriver legemiddelfrisettingen for resultatene fra *in vitro* FST.

#### *Hele og delte depottabletter: Test H1, H2, D1 og D2: Tablettcelle*

Resultatene fra to runder med triplert FST (n=6) viste betydelig variasjon i den målte konsentrasjonen av teofyllin for flertallet av prøvene både for hele og delte depottabletter. Spredningen i resultatene kan tyde på at nåværende metode for FST av hele og delte depottabletter i langt større grad enn ønsket er gjenstand for tilfeldige feil og usikkerhet.

Som vist i figur 16 er det målt høyere teofyllinkonsentrasjoner i prøvene fra delte depottabletter sammenlignet med prøvene fra hele depottabletter frem til tidsintervall nummer



12. Fordi det er stor spredning i analyseresultatene av disse prøvene og svært begrenset størrelse på datamaterialet (n=6) kan vi ikke si hvorvidt dette faktisk er en trend, om forskjellen er signifikant, eller om vi ville observert tilsvarende dersom vi hadde data fra flere repetisjoner av FST. Det samme gjelder figur 17, der det ut fra grafen kan se ut som den kumulative frisettingen [mg] er noe større for delte depottabletter sammenlignet med hele. Forskjellen ble ikke videre undersøkt med statistiske tester (eksempelvis t-test), og vi kan derfor verken bekrefte eller avkrefte hvorvidt en signifikant forskjell mellom frisettingsprofilene faktisk eksisterer. Men som følge av stor grad av overlapp i standardavvik til hele og delte depottabletter, er det liten sannsynligheten for at forskjellen er signifikant. Under disse testbetingelsene kan det derfor se ut som at deling ikke utgjør noen betydelig forskjell i frisettingsprofil, og at depottabletten kan deles uten at depoteffekten ødelegges, i overensstemmelse med produktbeskrivelsen (35). En systematisk litteraturgjennomgang av Richey et al (10) rapporterer at flere studier har funnet signifikant høyere frisettingsrate av teofyllin ved *in vitro* FST av OFDF med modifisert frisettingsprofil av teofyllin. På bakgrunn av disse tidligere testene bør vi heller ikke utelukke at en signifikant forskjell i frisettingsrate også eksisterer, men variasjonen i resultatene gjør dette vanskelig å vurdere på dette tidspunktet.

En annen observasjon verdt å bemerke var en konsekvent høyere teofyllinkonsentrasjon ble målt i prøven fra første tidsintervall. Dette gjaldt også FST av hele og delte depottabletter før FST av disse som triplett. Dette vises i figur 17 som en brattere stigning av kurvene for kumulativ frisetting i testens første 20 minutter. Per nå er vi usikre på om dette er en metodisk utfordring som må adresseres i det videre utviklingsarbeidet, eller om fenomenet er en del av produktets frisettingsprofil (17,32,37).

På grunn av dataene fra utviklingen av HPLC-metode med gradient eluering, og god presisjon hos kalibreringskurvenes målereplikater, ble analysemetoden vurdert å ha liten innvirkning på denne variasjonen i prøvekonsentrasjon. Foruten selve analysemetoden er det svært mange andre parametere som kan ha bidratt til variasjon. Andre studier har rapportert at både plassering/orientering av OFDF og tilstedeværelse av luftbobler i oppløsningsmedia kan være kilder til større variasjon i oppløsningshastighet og frisetting av virkestoff (52,54,55). Både formuleringsdesign og virkestoff var i denne studien ulikt fra depottablettene i vårt prosjekt, men vi kan ikke utelukke at disse faktorene har innvirket på resultatene.

*Test K1 (originalt oppsett av granulat -og pulvercelle) og test K2, K3 (revidert oppsett av granulat -og pulvercelle)*

Resultatene fra disse forsøkene viste at FST med knuste depottabletter er ekstra utfordrende med tanke på variasjon av teofyllinkonsentrasjon i prøvene fra samme tidsintervaller. En slik uforutsigbarhet i hvilke arealer som kan forventes, gjør det vanskeligere å tilpasse fortynningen av prøvene til kalibreringskurvens konsentrasjonsrekkevidde.

Et annet sentralt element som bør diskuteres i forbindelse med forsøkene med FST av knuste depottabletter i triplett er tetting av FTC. Pakking og klebing av pulverpartikler til den koniske metallsikten i granulat -og pulvercellen så ut til å oppstå hos samtlige gjennomstrømningsceller i forsøk K1, K2 og K3.

For alle gjennomstrømningscellene i test K1 ble metallsikten forflyttet opp mot cellehodet når oppløsningsmedia ble pumpet inn til cellen. Fra observasjonene i forsøket, så det ut til at metallsikten ikke greide å holde en stabil plassering i det øverste området av gjennomstrømningscellen. For FTC 3 ble også den koniske sikten veltet under forsøket. Slik kunne pulverpartikler strømme forbi på sidene av sikten og opp mot utførselsgangen av oppløsningsmedia. FTC 3 gikk tett underveis i dette forsøket (test K1). Som følge av erfaringene fra FST med knust depottablett fra de tidligere FST, vurderte vi velt av metallsikten som den sannsynligste årsaken til at FTC 3 gikk tett. Det ble antatt at metallsikten i granulat -og pulvercellene forhindrer pulverpartiklene fra å tette igjen utførselsgangen for oppløsningsmedia. Som følge av dette ble det et revidert oppsett av granulat og pulvercelle tatt i bruk. Et metallgitter ble plassert i cellen for å begrense forflytningen av metallsikten og motvirke velt av denne under testene (kapittel 2.2.1 *revidert oppsett av pulvercelle*). Dette oppsettet ble testet ut i test K2 og test K3.

Som følge av observasjonene som ble gjort under test K2, så det ut til at tiltaket med revidert oppsett av pulvercelle hadde fungert. Det innsatte gitteret stoppet metallsiktene fra å nå den øverste delen av FTC der det var risiko for at metallsiktene plasserte seg skjevt eller veltet. Andre årsaker til tetting av FTC bør derfor vurderes. For eksempel klebing av pulverpartikler til metallsikten, eventuelt at de minste pulverpartiklene kleber seg til filter ved utførselsgangen av FTC og blokkerer oppløsningsmedia fra å strømme videre ut av FTC.

Fra det som drøftes i dette kapitlet kan tyde på at det fremdeles er svært mange faktorer knyttet til metoden for FST av knuste depottabletter som vi ikke har kontroll over og som bidrar til uforutsigbare variasjoner i resultatene og prestasjonen til metoden for FST av knust depottablett så langt.

Når det gjelder konsentrasjon av teofyllin i prøvene eller målt areal fra disse FST er det eneste vi kan trekke ut fra resultatene at knusingen som forventet ser ut til å ødelegge depoteffekten. Den kumulative frisettingskurven i figur 18 (kapittel 4.3.2) viser at tilnærmet alt virkestoff er frisatt i løpet av de første 20 minuttene.

### 5.1.5 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode

Som følge av den store usikkerheten i resultatene fra FST av hele, delte og knuste depottabletter, ønsket vi å gjøre noen nærmere undersøkelser av analysemetoden med HPLC og stabilitet til teofyllin i en vandig løsning. Fremdeles gjenstår mye arbeid for å fullføre metodeutviklingen, og disse undersøkelsene hadde ikke til hensikt å være en validering. Bakgrunnen for undersøkelsene var å få noen holdepunkter om stabiliteten til teofyllinløsninger og HPLC-analysen sitt bidrag til usikkerheten i resultatene fra FST. På grunn av begrensninger i tid og ressurser ble det brukt enklere tilnærminger for å undersøke disse parameterne, enn de standardiserte metodene som beskrives i offisielle retningslinjer som ICH og FDA. Resultatene må derfor tolkes med forsiktighet.

Fra undersøkelsene som ble utført angående stabiliteten til teofyllin i en vandig løsning, ser det ut til at det ikke er stabilitetsutfordringer knyttet til varighet av FST i apparat 4 og lang analysetid av prøver fra FST og standardløsninger i HPLC. Vi kan derfor anta en viss stabilitet av prøvene innenfor et tidsrom på 48 timer.

Metodens nøyaktighet er et parameter som vanligvis undersøkes gjennom å «spike» en placeboformulering bestående kun av hjelpestoffene til produktet, med en kjent mengde virkestoff. Videre undersøkes det hvor stor andel av virkestoffmengden som blir gjenfunnet i analysen (85,86). Blant begrensningene i ressurser var eksempelvis tilgang på hjelpestoffer, og informasjon om mengde av hvert hjelpestoff i Theo-Dur® depottabletter. Det var derfor ikke mulig å komponere en representativ blanding av hjelpestoffer tilsatt kjent mengde rent teofyllin. Tilnærmingen for å evaluere nøyaktigheten til vår analysemetode (av prøver med løsning av teofyllin fra Theo-Dur® depottabletter) var ikke ideell med hensyn til hvordan det

vanligvis gjøres i henhold til offisielle retningslinjer, som ICH eller FDA. En utfordring er at deklarerert mengde teofyllin i Theo-Dur® depottabletter ikke nødvendigvis er nøyaktig 300 mg, og at små variasjoner i dose kan forekomme. Et annet aspekt er at det ikke nødvendigvis vil være like forhold av teofyllin og øvrige hjelpestoffer fra knust depottablett mellom hvert uttak av 50 mg pulverblanding til løsningene som ble laget. Dette kan bidra til både til en tilsynelatende økt recovery eller redusert recovery. I tillegg kan en forskjell i recovery oppstå som følge av at tilsatt teofyllin anhydrat ikke er bundet til hjelpestoffer på samme måte som er forventet av teofyllin i pulverblandingen av knuste Theo-Dur® depottabletter. Dette kan føre til høyere recoveryprosent av tilsatt teofyllin, sammenlignet med recovery fra en placeboformulering av Theo-Dur® med kjent mengde teofyllin tilsatt og inkorporert i formuleringen (87). Resultatene fra denne recovery-undersøkelsen samsvarer ganske godt med verdiene for recovery som ble funnet i forsøket med bestemmelse av mengde teofyllin i Theo-Dur® depottabletter. Med svakhetene til dette forsøksdesignet tatt i betraktning, så kan resultatene peke i retning av at det ikke er betydelig avvik mellom hva som kan antas å være korrekte verdier og verdier fra analysemetodens målinger.

Til slutt ble det utført en undersøkelse av sprøytefiltreringen for å undersøke om det er tegn til retensjon av teofyllin i sprøytefiltre, eller om filtreringen på andre måter bidrar til å påvirke analyseresultatene (85). Resultatene fra filtertest 1 viser at forskjellen i gjennomsnittsareal til teofyllin fra HPLC-analysen mellom filtrert og ufiltrert er liten. Dette kan indikere at filtrering (med forkasting av de første 4 mL filtrat) ikke vil påvirke målingene av standardløsninger med denne teofyllinkonsentrasjon 40,2 mg/L. Filtertest 2 analyserer hver av de seks mL av filtrat fra en teofyllinløsning med konsentrasjon 1,01 mg/L. Her ses atskillig større differanser mellom filtrert og ufiltrert løsning, selv for de siste mL av løsningen som ble filtrert. Fra tabell 16 kan det også virke som disse forskjellene i areal er signifikante med hensyn til lav variasjon mellom prøvereplikatene (lave verdier til standardavvik og relativt standardavvik). Det er likevel vanskelig å si noe mer konkret om disse funnene siden de er bygget på et veldig begrenset antall målinger. Filtertest 2 har imidlertid generert et nytt spørsmål når det gjelder hvorvidt tilstrekkelig mengde filtrat forkastes før prøver og standardløsninger analyseres i HPLC. Det ble ikke foretatt undersøkelser av sprøytefiltrering av teofyllinløsninger som også inneholder hjelpestoffer, for eksempel prøve fra FST av Theo-Dur® depottabletter eller løsning av knuste Theo-Dur® depottabletter. En slik undersøkelse kunne ha gitt mer innsikt i om filtrering er problematisk for prøvene fra FST, spesielt med tanke på at alle prøvene fra en

FST har blitt filtrert gjennom samme sprøytefilter. Her er det også en risiko for at små fragmenter med uoppløst virkestoff følger med oppsamlet prøve fra et tidsintervall og holdes tilbake i sprøytefilteret. Slike fragmenter i filteret kan fortsette å frigjøre virkestoff under filtrering av prøver fra senere tidsintervaller, og gi høyere virkestoffkonsentrasjoner i disse prøvene og slik innvirke på frisettingsprofilen fra en FST (53). Ved filtertest av prøver fra løsninger som også kan inneholde hjelpestoffer fra Theo-Dur® depottabletter, bør det trolig gjøres en prøveopparbeidelse av prøvene som ikke blir filtrert før injeksjon i HPLC. Sentrifugering kan da være et alternativ for å fjerne komponenter i prøven som kan tette HPLC-kolonnen (75).

## 5.2 Noen av hovedutfordringene gjennom prosjektet

### 5.2.1 Utvikling av metode for HPLC-analyse

Ifølge LoBrutto (75) er det generelt ikke anbefalt å bruke samme HPLC-kolonne i flere metodeutviklingsprosjekter, dette frarådes spesielt i forbindelse med blant annet FST og stabilitetstesting av farmasøytiske preparater. Frarådselen fra LoBrutto er kanskje mer rettet mot utvikling av HPLC-metoder i tilknytning til legemiddelutvikling og farmasøytisk industri, enn dette masterprosjektet. Basert på erfaringene med utvikling av HPLC-metode i starten av prosjektet, anses rådet til LoBrutto å være av en viss relevans (75).

En stor del av den første prosjektetiden gikk til å forsøke å utvikle en egnet analysemetode med en eldre HPLC-kolonne som har vært brukt i tidligere prosjekter. Vi hadde ikke kontroll over hvilke mobilfaser eller hvilke prøvematerialer som var brukt i disse prosjektene.

Egenskapene til C18-kolonner endres gjennom bruk og over tid, og endringene kan være både av reversibel og irreversibel karakter (74,88). Det kan tenkes at tidligere bruk av HPLC-kolonnen(e) har bidratt til å gjøre metodeutviklingen til HPLC i starten av prosjektet sårbar for kromatografiutfordringene som oppsto. Den første HPLC-kolonnen var også pakket med en svært finpartikulær stasjonærfase (2,7 µm partikkeldiameter), og kolonnen var kanskje i utgangspunktet ikke egnet til analyse av prøvene fra oppløsningstester av Theo-Dur® depottabletter. Forsøkene på å lokalisere årsaker til analyseproblemene, rense og gjenopprette ytelsen til HPLC-kolonner tok mye tid og arbeid. Trolig ville denne metodeutviklingen vært mer effektiv dersom en HPLC-kolonnen ble valgt med hensyn til egnede egenskaper for vårt prosjekt. For eksempel undersøke hvilke HPLC-kolonner som egner seg til analyse av prøver som inneholder både virkestoff og hjelpestoffer fra OFDF.

### 5.2.2 Utvikling av frisettingstester i apparat 4

Utvikling av FST for hele, delte og knuste Theo-Dur® depottabletter i dette prosjektet ble svært utfordrende fordi det er mange metodeparametere vi ikke har oversikt eller kontroll over. Opprinnelig målsetting var å utvikle FST med kunstig mage- og tarmsaft, inkludert et lignende simulert skifte mellom magesekk og tynntarm som studien (62). Flere årsaker har bidratt til at opprinnelig målsetting ikke ble nådd i løpet av prosjektiden. For eksempel var FST i tripletter med vann som oppløsningsmedia i utgangspunktet aldri planlagt. Disse testene ble en konsekvens av forsinkelsen i en levering av sprøytefiltre som var kompatible med/spesielt egnet for filtrering av kunstig mage -og tarmsaft. Følgen av de triplete FST var at vi for alvor ble oppmerksomme på omfanget av problemene med variert prøvevolum. Hvorvidt dette har påvirket forsøkene som ble utført i apparat 4, gir en usikkerhet som gjør det vanskelig å kunne trekke konklusjoner av resultatene fra FST.

På grunnlag av resultatene fra kalibreringsforsøkene (se appendiks 6) og korrespondansen med produsenten av apparat 4, er videre FST stoppet inntil feilen er identifisert og rettet opp. Slik unngikk vi også unødvendig «sløsing» av kunstig mage -og tarmsaft til forsøk hvor det er usikkert om instrumentelle feil påvirker forsøket. Usikkerheten i resultatene fra FST som ble gjennomført med vann som oppløsningsmedia og at metodeutviklingen på dette tidspunktet ikke er fullført, er årsakene til at resultatene fra FST heller ikke ble undersøkt nærmere. For eksempel statistiske tester for å undersøke hvorvidt det forelå signifikante forskjeller mellom ulike resultater eller ikke.

### 5.2.3 Frisettingstest av knuste depottabletter i apparat 4

Det som utmerket seg som spesielt utfordrende i utviklingen av FST med knuste Theo-Dur® depottabletter var store og uforutsigbare variasjoner i teofyllinkonsentrasjon i prøvene fra hvert tidsintervall (variasjoner i frisettingsprofil). At det ville være noe større variasjoner i konsentrasjon i disse prøvene sammenlignet med variasjonen fra FST av hele og delte depottabletter, var som forventet. Theo-Dur® depottabletter er et industrielt produkt som er laget med reproduerbare fremstillingsprosesser, under streng kontroll når det gjelder produktkvalitet. Dette inkluderer en forutsigbar og reproducerbar frisetting av virkestoffet fra OFDF (9). I dette prosjektet individualiserer vi flere av depottablettene gjennom knusing før

FST. Da innføres også større variasjoner i resultatene fra FST, på samme vis som Logrippo et al poengterer i sin artikkel at knusing av OFDF i morter ikke kan anses å være tilstrekkelig reproducerbar metode for manipulering fra et kvalitetskontrollperspektiv (9).

Metoden vi valgte å knuse depottablettene på i dette prosjektet var også i svært liten grad standardisert. Selv om det ble brukt morter og pistill av samme type og størrelse, og at vi visuelt forsøkte å oppnå tilnærmet lik knusningsgrad/homogen pulverblanding, hadde vi ikke kontroll over følgende:

- Knusningstid/blandingstid for å oppnå homogen pulverblanding fra depottabletten.
- Hvorvidt knusingen av hver depottablett ble utført med ulik kraft/trykk.
- Om svinnet av pulverpartikler i overføring til FTC var homogent.
- Partikkelstørrelsesfordeling

Blant annet vil det være en viss variasjon i partikkelstørrelsesfordelingen til pulveret fra knust depottablett (9). Med andre ord fører knusingen av Theo-Dur® depottabletter i morter til større dosevariasjon mellom hver knust depottablett som testes, sammenlignet med dosevariasjonen som eksisterer mellom hver hel eller delt depottablett som testes. Ifølge Gray (61) er faktorer knyttet til formuleringen en av hoved omstendighetene som kan føre til variabilitet i resultatene av FST. Det kan være komponenter fra filmdrasjeringer som fører til klebing av hele eller deler av formuleringen til veggene eller komponenter i apparatet, eller kleber seg til virkestoff. Støtter vi oss på diffusjonsbaserte modeller som Nernst-Brunner ligningen (se ligning 1) er det en direkte sammenheng mellom overflateareal og oppløsningshastighet (22,25). En reduksjon i overflateareal fører da til en reduksjon i frisettingsrate.

Alle fenomenene som kan tenkes å påvirke frisettingsraten opptrer trolig ikke på identisk vis ved hver FST med metodene som er forsøkt for FST av knuste Theo-Dur® depottabletter i prosjektet. Dette stemmer også overens med variasjonene vi har observert, som uforutsigbar tetting av FTC og variasjoner av hvordan pulveret distribuerer seg i FTC underveis i FST. Ulik distribuering av pulver fra knust depottablett i FTC kan tenkes å gi opphav til variasjoner i prøvene, basert på flere kilder som beskriver at frisettingsraten også kan være posisjonsavhengig: Ulik plassering i FTC kan gi ulik grad av påvirkning av skjærekrefter fra oppløsningsmedia (61). Shiko et al (54) fant i sine eksperimenter at glasskuler (1 mm diameter) i bunnen av FTC ikke kunne garantere for et homogent gjennomstrømningsfelt i

FTC (tablettceller), uten at vi med sikkerhet kan konkludere at dette har vært tilfelle eller har påvirket frisettingen av teofyllin i våre forsøk.

Fordi det ifølge Nernst-Brunners modell er en direkte sammenheng mellom overflateareal og oppløsningshastighet (22,25), vil ulik partikkelstørrelsesfordeling som følge av knusing i morter kunne føre til variasjoner i frisettingshastighet ved FST i apparat 4 (9). Størrelsen på partikler av teofyllin vil selvsagt kunne ha noe variasjon, og dermed være av betydning. Men knusingen fører også til at pulverblandingen får hjelpestoffer av ulik partikkelstørrelse. Eksakt hvordan dette har innvirket på frisettingen av teofyllin i forsøkene er ukjent. I forbindelse med produksjon av OFDF er det kjent at både blandeprosessen og blandingstid av kan påvirke produktens tekniske egenskaper, som tilsynelatende løselighet av virkestoff (engelsk; apparent solubility) og frisettingsprofilen fra doseringsformen. For eksempel kan partikkelstørrelsen påvirke adhesjonsegenskapene til magnesiumstearat, der større overflatearealer gir bedre evne til adhesjon og filmdannelse (89). Magnesiumstearat er veldig hydrofobt, vannavstøtende og adhesjon til partikler med virkestoff reduserer tilgjengelig overflateareal for oppløsning i FST, og dermed hemme frisetting (48). Siden pulverblandingen består av både teofyllin og hjelpestoffene fra depottabletten, er det trolig uhensiktsmessig å forsøke og kontrollere denne variabelen gjennom eksempelvis sikting av pulverblandingen før overføring til FTC.

En annen kilde som kan tenkes å medvirke til variasjon i resultatene fra FST er små forskjeller i masse av knust depottablett som ble overført til FTC. Etter knusing ble det forsøkt å overføre så mye som mulig av pulverblandingen fra depottabletten til FTC.

Praktiske utfordringer i forbindelse med overføringen var at:

- Pulverrester festet seg som flak eller film til morter, pistill og kortblad og var vanskelig å få fjernet.
- Ved knusing av enkelte av depottablettene ble det observert større elektrostatiske ladning. Dette bidro til utfordringer med overføring av pulveret til FTC, og kan ha medvirket til økt svinn.

Hovedutfordringen her er at vi ikke vet i hvilken grad variasjon av svinn ved knusing og overføring av Theo-Dur® depottabletter kan ha medvirket til spredningen i resultatene fra FST.



#### 5.2.4 Normalitet i resultatene fra de triplete FST

En svakhet er at kun ble undersøkt for triplett med hele depottabletter (Test H1 og H2) og ikke de øvrige triplettene med delt og knust. For test H1 og H2 ble det funnet to avvik i normalfordeling av resultatene, der spredningen i konsentrasjon funnet i prøvene tidsintervall nr. 8 ligger langt under  $P = 0.05(81)$ . Her kan det være at ekstremverdier påvirker gjennomsnittet og spredningen i resultatene. Mest sannsynlig vil det være et lignende bilde i resultatene fra de andre FST: ikke nødvendigvis en konsistens i normalfordeling av data. Det ble likevel valgt å bruke aritmetisk gjennomsnitt som mål på sentraltendens, standardavvik og relativt standardavvik som mål på spredning. Bakgrunnen er at vi har en svært begrenset datamengde for å vurdere normalitet i dataene. Det er også en usikkerhet i påliteligheten til resultatene fra FST som skyldes at teknisk feil med apparat 4 ikke kan utelukkes for alle FST som er utført i prosjektet.

#### 5.3 Videre arbeid

Nye metoder som utvikles må oppfylle en del ønskede egenskaper, som viser at metodene er egnet for sitt formål. Dette gjøres gjennom metodevalidering. Vi forsøkte underveis og på slutten av prosjektet å anvende noen av disse valideringsparameterne for å kunne evaluere metodeutviklingsprosessen både for FST og analysemetode i HPLC. Funnene fra evaluering av prosessparametere peker i retning av at største kilde til variasjon i våre resultater er knyttet til metode for FST, apparat 4 og prøveopparbeidelsen.

Når FST gir stor grad av variasjon i resultatene kan det tyde på at metodene for FST av Theo-Dur® depottabletter som ble testet så langt i prosjektet er lite robust (61) og/eller at vi har for lite kontroll over alle variablene som påvirker frisetting av teofyllin.

Basert på erfaringene fra prosjektet bør en videre metodeutvikling blant annet tilstrebe en større kontroll over variablene som kan påvirke frisettingen av teofyllin, og øvrige faktorer som kan påvirke resultatene av FST. Dette gjelder særlig for FST av de knuste depottablettene, fordi uforutsigbare variasjoner i resultatene gjør det utfordrende å etablere fortynningsprosedyrer og tilpasse teofyllinkonsentrasjonen i prøvene med konsentrasjonsrekkevidden til kalibreringskurven.

Når det gjelder HPLC-analyse med gradient elueringsmetode tyder resultatene fra forsøk og ukentlige analyser av standardløsninger av teofyllin, at vi har en egnet analysemetode for å kvantifisere teofyllin i prøvene fra FST når det gjelder hele og delte Theo-Dur®

depottabletter med vann som oppløsningsmedia. Fra forsøkene ser det ikke ut som at det foreligger større utfordringer når det gjelder HPLC-metodens instrumentelle presisjon, repeterbarhet, sensitivitet og selektivitet. Det må likevel bemerkes at disse forsøkene ikke har vært ment å være del av en validering, men kun en kartlegging for å finne ut hva som kan ha bidratt til den usikkerheten som ligger i resultatene etter at prøvene fra FST er analysert. Metoden vi nå bruker for HPLC-analyse har imidlertid noen betydelige ulemper. Disse er lang analysetid og stort forbruk av organiske løsemidler. Metoden for HPLC-analyse bør derfor videre optimaliseres med tanke på å forkorte analysetiden.

### 5.3.1 Drøfting av prosjektet, behov for metode og videre forskning

Når arbeidet med dette prosjektet startet, var hovedmålsettingen å utvikle en metode for FST under simulerte GI-betingelser i apparat 4 med Theo-Dur® depottabletter som modellpreparat. Videre skulle det utvikles en tilhørende analysemetode for HPLC-UV for konsentrasjonsbestemmelse av teofyllin i prøvene fra FST med apparat 4. Disse metodene skulle valideres og deretter anvendes til å undersøke *in vitro* frisetting av teofyllin fra manipulerte og intakte Theo-Dur® depottabletter. Metodeutviklingsprosessen har vært gjenstand for stadige endringer som følge av at teknisk utstyr ødelegges eller apparater svikter, uventede resultater eller hendelser i utførte forsøk/tester, granskning av mulige årsaker til dette, forsøk på reparasjoner og utbedringer og forsinkelser i vareleveranser. På grunn av et uforutsigbart og til tider kronglete hendelsesforløp gjennom dette masterprosjektet, så ble målsettingen og kanskje formålet med arbeidet også til dels endret. Arbeidet har i stor grad vært preget av å håndtere utfordringer i den rekkefølgen de kommer, med forsøk på metodeutvikling mellom hver ny overraskelse. Gjennom dette arbeidet har vi lært at det er svært mange faktorer man må ta hensyn til i et metodeutviklingsarbeid, og at det krever en grundigere planlegging enn det vi hadde mulighet til i prosjektet. Dette inkluderer både utvikling av FST i apparat 4 med sikte på simulerte GI-betingelser og utvikling av HPLC-metode for analyse av prøvene fra FST.

Å undersøke hvordan manipulering av OFDF påvirker frisettingen av virkestoff med *in vivo*-studier er problematiske med tanke på både etikk og tilgang på nødvendige ressurser (15,16). Det å konstruere et kunstig GI miljø kan være en mulighet for å studere hvordan frisettingen av virkestoff påvirkes av for eksempel knusing og deling av en depottablett. Særlig for OFDF med modifisert frisetting av legemidler med BCS-klasse 1: Høy løselighet og høy

permeabilitet, som teofyllin, fordi absorpsjonsraten av legemidlet av slike legemidler i stor grad er gjenspeilet i frisettingsraten av legemiddel fra doseringsformen (17). Med en optimal og egnet metode med simulerte GI-betingelser, kan man ikke bare studere hvordan frisettingen kan endres ved manipulering av doseringsenheten, men metoden kan også ha predikativ verdi for hvordan dette påvirker opptaket av legemidlet og plasmakonsentrasjon hos pasienten (17). Slik informasjon kan brukes til å gi et større bilde av hvilke konsekvenser knusing eller deling kan tenkes å gi. På denne måten kan en slik metode for FST bidra til å fylle kunnskapshull fordi det er relativt få studier som ser nettopp på hvordan slik manipulering påvirker frisettingsraten. Kunnskap om konsekvensene er viktig for å bedre kartlegge hvilke konsekvenser en utbredt praksis med knusing og deling av OFDF kan tenkes å ha.

Utfordringene som vi har sett gjennom prosjektet, og som også gjenspeiler seg i eksisterende litteratur, er at utvikling av metoder for FST av denne typen kan være veldig krevende av flere årsaker. Testen må reflektere de GI-faktorene som påvirker frisettingen av virkestoff for akkurat et bestemt preparat. Hvilke faktorer dette er vil variere alt etter hvordan doseringsformen er formulert og hvilke virkestoff det er snakk om (17). Sistnevnte gjelder også for FST som ikke er ment å simulere GI-traktus. For eksempel FST med kun vann som oppløsningsmedia, som var det vi kom i metodeutviklingen. Generelt i *in vitro* FST er det mange faktorer som samvirker. Selv en FST i apparat 4 med kun vann som oppløsningsmedia kan ses på som et komplekst system bestående av et intrikat samspill mellom mange variabler. Noen av variablene er kjent og har mulighet for justering, slik som gjennomstrømningshastighet i FTC. Det kan også være andre variabler som påvirker resultatene som ikke er like åpenbare og utenfor rekkevidden av denne oppgaven (54). Vi kan derfor ikke med sikkerhet si hvilke faktorer som har påvirket våre resultater og av den årsak har vi oppnådd veldig få resultater fra det arbeidet som er utført i prosjektet. Likevel har dette arbeidet også noe verdi i seg selv, til tross for at en ferdig utviklet metode fremdeles mangler.

Dette masterprosjektet har bidratt til å belyse flere metodiske utfordringer knyttet til metodeutvikling av FST med apparat 4. Flere av disse utfordringene må løses for å komme videre i metodeutviklingsarbeidet av FST med apparat 4 under simulerte GI-betingelser. Det bør kanskje også gjøres en avveining når det gjelder hvor ressurskrevende en slik videre metodeutvikling vil bli opp mot metodens nytteverdi. Bakgrunnen for dette baseres på litteraturen som er lest gjennom prosjektarbeidet. Her rettes søkelyset i stor grad på hvor

kompleks utviklingen av FST med biorelevante betingelser kan være. Anvendbarheten av utviklet metode ser også ut til å være begrenset når det gjelder overførbarheten mellom ulike preparater. Man må regne med at metoden må utvikles på ny eller nøye tilpasses dersom man ønsker å teste andre legemiddelpreparater enn Theo-Dur® depottabletter (17). I flere studier som tar for seg problematikken med knusing og deling av OFDF, blir mangelen på tilpassede formuleringer belyst. For eksempel alderstilpassede formuleringer til barn eller eldre der svelging av større tabletter eller kapsler kan være utfordrende (4,5,9,10).

Manipulering av OFDF er et problem som eksisterer, vi vet det utgjør en pasientrisiko og viktige årsaker til at denne praksisen forekommer ser ut til å være mangelen på markedsførte pasienttilpassede preparater eller preparater med bestemte styrker. Ut fra denne kunnskapen og gjennom arbeidet i prosjektet, er det et spørsmål om det bør satses mer på forskning og utvikling av biorelevante *in vitro* FST tilknyttet utviklingen av mer pasienttilpassede formuleringer (9,17).

1. Zeiss DH, Amundstuen L. Information Regarding Modification of Oral Solid Medicines in Written Drug Information: Potential Consequences for patient Safety. I: Medication Safety in Municipal Health and Care Services. Cappellen Damm Akademisk; 2022. s. 91–111.
2. Koziolk M. Gastrointestinal Transit and Hydrodynamics Under Fasting and Fed Conditions. I: Oral Drug Delivery for Modified Release Formulations/edited by Edmund S Kostewicz, Maria Vertzoni, Heather A E Benson, Michael S Roberts. USA: John Wiley & Sons;
3. Nissen LM, Haywood A, Steadman KJ. Solid Medication Dosage Form Modification at the Bedside and in the Pharmacy of Queensland Hospitals. J Pharm Pract Res. juni 2009;39(2):129–34.
4. Johannesson J, Hansson P, Bergström CAS, Paulsson M. Manipulations and age-appropriateness of oral medications in pediatric oncology patients in Sweden: Need for personalized dosage forms. Biomed Pharmacother. februar 2022;146:112576.
5. Bjercknes K, Bøyum S, Kristensen S, Brustugun J, Wang S. Manipulating tablets and capsules given to hospitalised children in Norway is common practice. Acta Paediatr. mars

2017;106(3):503–8.

6. Solberg H, Andreassen Devik, S, Bell HT, Horst Zeizz D, Olsen RM. Drug modification by nurses in Norwegian nursing homes: A crosssectional study. *Geriatr Nur (Lond)*. 2021;42:351–7.
7. T. Schiele J, Quinzler R, Klimm HD, G. Pruszydlo M, E. Haefeli W. Difficulties swallowing solid oral dosage forms in a general practice population: prevalence, causes, and relationship to dosage forms. *Eur J Clin Pharmacol*. 2013;(69):937–48.
8. Verrue C, Mehuys E, Boussery K, Remon JP, Petrovic M. Tablet-splitting: a common yet not so innocent practice. *J Adv Nurs*. 2011;67(1):6–32.
9. Logrippo S, Ricci G, Sestili M, Cespi M, Ferrara L, Palmieri GF, mfl. Oral drug therapy in elderly with dysphagia: between a rock and a hard place! *Clin Interv Aging*. januar 2017;Volume 12:241–51.
10. Richey RH, Hughes C, Craig JV, Shah UU, Ford JL, Barker CE, mfl. A systematic review of the use of dosage form manipulation to obtain required doses to inform use of manipulation in paediatric practice. *Int J Pharm*. februar 2017;518(1–2):155–66.
11. Butler SF, Black RA, Fleming AB. Relative Abuse of Crush-Resistant Prescription Opioid Tablets via Alternative Oral Modes of Administration. *Pain Med*. 1. august 2018;19(8):1613–27.
12. Ganzetti R, Logrippo S, Sestili M, Caraffa A, Cespi M, Pelliccioni G, mfl. Tablet Splitting in Elderly Patients with Dementia: The Case of Quetiapine. *Pharmaceutics*. 20. september 2021;13(9):1523.
13. Guideline on the pharmacokinetic and clinical evaluation of modified release dosage forms [Internett]. European Medicines Agency; 2014. Report No.: EMA/CHMP/EWP/280/96 Rev1. Tilgjengelig på: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-pharmacokinetic-clinical-evaluation-modified-release-dosage-forms\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-pharmacokinetic-clinical-evaluation-modified-release-dosage-forms_en.pdf)
14. Wang Q, Fotaki N, Mao Y. Biorelevant Dissolution: Methodology and Application in Drug Development. *Dissolution Technol*. 2009;16(3):6–12.
15. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm*. juni 2015;93:173–82.
16. Sjögren E, Abrahamsson B, Augustijns P, Becker D, Bolger MB, Brewster M, mfl. In vivo methods for drug absorption – Comparative physiologies, model selection, correlations with in vitro methods (IVIVC), and applications for formulation/API/excipient

characterization including food effects. *Eur J Pharm Sci.* juni 2014;57:99–151.

17. Klein S. Dissolution Test Considerations for Oral Multiparticulate Systems. I: Rajabi-Siahboomi AR, redaktør. *Multiparticulate Drug Delivery* [Internett]. New York, NY: Springer New York; 2017 [sitert 26. september 2023]. s. 169–212. (*Advances in Delivery Science and Technology*). Tilgjengelig på: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4\\_8](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4_8)
18. Sutton SC. *Drug Administration and Drug Absorption. I: Basic pharmacokinetics and Pharmacodynamics: An integrated Textbook and Computer Simulations*/Edited by Sara E Rosenbaum. 2. utg. John Wiley & Sons; 2017.
19. Ashford M. *Gastrointestinal tract- physiology and drug absorption. I: Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*/Edited by Michael E Aulton, Kevin M G Taylor. 5. utg. Elsevier; 2018.
20. Kristensen HG. *Tabletteknologi. I: Almen Farmaci.* 4. utg. København: Academic books; 2008. s. 210.
21. Chemistry (IUPAC) TIU of P and A. IUPAC - dissolution (D01806) [Internett]. [sitert 26. september 2023]. Tilgjengelig på: <https://goldbook.iupac.org/terms/view/D01806>
22. Seager RJ, Acevedo AJ, Spill F, Zaman MH. Solid dissolution in a fluid solvent is characterized by the interplay of surface area-dependent diffusion and physical fragmentation. *Sci Rep.* 2018;8(7711):1–15.
23. Noyes AA, Whitney WR. THE RATE OF SOLUTION OF SOLID SUBSTANCES IN THEIR OWN SOLUTIONS. *J Am Chem Soc.* desember 1897;19(12):930–4.
24. Talevi A, redaktør. *The ADME Encyclopedia: A Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics* [Internett]. Cham: Springer International Publishing; 2022 [sitert 26. september 2023]. 341–349 s. Tilgjengelig på: <https://link.springer.com/10.1007/978-3-030-84860-6>
25. Dokoumetzidis A, Macheras P. A century of dissolution research: From Noyes and Whitney to the Biopharmaceutics Classification System. *Int J Pharm.* september 2006;321(1–2):1–11.
26. Charalabidis A, Sfouni M, Bergström C, Macheras Panos. The Biopharmaceutics Classification System (BCS) and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System (BDDCS): Beyond guidelines. *Int J Pharm.* juli 2019;566:264–81.
27. Bergström C, Holm R. *Preformulation Considerations for Design of Oral Modified-Release Products. I: Oral Drug Delivery for Modified Release Formulations*/edited by Edmund S Kostewicz, Maria Vertzoni, Heather A E Benson, Michael S Roberts. John Wiley & Sons; 2022.

28. Statens legemiddelverk [Internett]. [sitert 26. september 2023]. Depottabletter - Legemiddelverket. Tilgjengelig på: <https://legemiddelverket.no/godkjenning/nls/preparater-og-legemiddelformer/standarder-for-legemiddelformer/standarder-for-legemiddelformer-og-betegnelser-som-kan-benytted-ved-merking/d#depottabletter>
29. Statens legemiddelverk [Internett]. [sitert 26. september 2023]. Tabletter med modifisert frisetting - Legemiddelverket. Tilgjengelig på: <https://legemiddelverket.no/godkjenning/nls/preparater-og-legemiddelformer/standarder-for-legemiddelformer/standarder-for-legemiddelformer-og-betegnelser-som-kan-benytted-ved-merking/t#tabletter-med-modifisert-frisetting>
30. Adepu S, Ramakrishna S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*. 29. september 2021;26(19):5905.
31. Chen T, Li J, Chen T, Sun CC, Zheng Y. Tablets of multi-unit pellet system for controlled drug delivery. *J Controlled Release*. september 2017;262:222–31.
32. Thommes M, Kleinebudde P. The Science and Practice of Extrusion-Spheronization. I: Rajabi-Siahboomi AR, redaktør. *Multiparticulate Drug Delivery* [Internett]. New York, NY: Springer New York; 2017 [sitert 26. september 2023]. s. 37–63. (Advances in Delivery Science and Technology). Tilgjengelig på: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4\\_3](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4_3)
33. Abdul S, Chandewar AV, Jaiswal SB. A flexible technology for modified-release drugs: Multiple-unit pellet system (MUPS). *J Controlled Release*. 1. oktober 2010;147(1):2–16.
34. Theo-Dur «Karo Pharma» - Felleskatalogen [Internett]. [sitert 26. september 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.felleskatalogen.no/medisin/theo-dur-karo-pharma-564607#spc-preparatomtale>
35. SPC Preparatomtale Theo-Dur 300 mg depottablett [Internett]. 2023. Tilgjengelig på: [https://www.legemiddelsok.no/\\_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/0000-06608.pdf](https://www.legemiddelsok.no/_layouts/15/Preparatomtaler/Spc/0000-06608.pdf)
36. Theo-Dur® - FASS Allmänhet [Internett]. [sitert 26. september 2023]. Tilgjengelig på: <https://www.fass.se/LIF/product?userType=2&nplId=19791019000065>
37. Morikawa N, Takeyama M, Higuchi K, Tsukamoto T, Nakano M, Terada H. A Pharmacokinetic Study of Theophylline Following Single Oral Dosing of Sustained-Release Preparations(Theo-Dur). *J-STAGE*. 1991;17(5).
38. Koeter G, Jonkman J, Vries K, Schoenmaker R, Greving J, Zeeuw R. Pharmacokinetics of sustained release theophylline in low and high multidose regimens. *Br J Clin Pharmacol*. november 1981;12(5):647–51.

39. Panoz DE, Geoghegan EJ. Sustained absorption pharmaceutical composition. EP 0122077B1.
40. Petereit HU, Lizio R, Ravishankar H, Samel A. Multiparticulate pharmaceutical form comprising pellets with a matrix which influences the delivery of a modulatory substance. Darmstadt; WO 2006/102965 A1, 2006.
41. Shepard M, Munch JC, Kantor J. Theophylline-Noscapine sustained release composition for treatment of Asthma [Internett]. USA; US3109775. Tilgjengelig på: <https://patentimages.storage.googleapis.com/62/c9/8f/a7e6e66d5abd38/US3109775.pdf>
42. Siepmann J, Siepmann F. Mathematical modeling of drug delivery. *Int J Pharm.* desember 2008;364(2):328–43.
43. Rajabi-Siahboomi AR. Overview of Multiparticulate Systems for Oral Drug Delivery. I: Rajabi-Siahboomi AR, redaktør. *Multiparticulate Drug Delivery* [Internett]. New York, NY: Springer New York; 2017 [sitert 26. september 2023]. s. 1–4. (*Advances in Delivery Science and Technology*). Tilgjengelig på: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4\\_1](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4_1)
44. Sidwell R, Hansell J, Rane M, Rajabi-Siahboomi AR. Characterization of Inert Cores for Multiparticulate Dosage Forms. I: Rajabi-Siahboomi AR, redaktør. *Multiparticulate Drug Delivery* [Internett]. New York, NY: Springer New York; 2017 [sitert 26. september 2023]. s. 5–35. (*Advances in Delivery Science and Technology*). Tilgjengelig på: [http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-7012-4_2)
45. Banakar UV. *Pharmaceutical dissolution testing, bioavailability, and bioequivalence: science, applications, and beyond*. Hoboken: John Wiley; 2022. Kap. 1.
46. Freire AC, Basit AW. Dissolution testing of solid dosage forms. I: Aulton's *Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*. 5. utg. Elsevier; 2018. s. 626–37.
47. Vaghela B, Kayastha R, Bhatt N, Pathak N, Rathod D. Development and validation of dissolution procedures. *J Appl Pharm Sci*.
48. Zampi P, Flanagan, E, Meehan J, Fotaki N. Impact of Magnesium Stearate Presence and Variability on Drug Apparent Solubility Based on Drug Physicochemical Properties. *AAPS J.* 22(75).
49. Elder DP, Kuentz M, Holm R. Pharmaceutical excipients — quality, regulatory and biopharmaceutical considerations. *Eur J Pharm Sci.* mai 2016;87:88–99.
50. Abe H, Otsuka M. Effects of lubricant-mixing time on prolongation of dissolution time and its prediction by measuring near infrared spectra from tablets. *Drug Dev Ind Pharm.* april 2012;38(4):412–9.



51. Otsuka M, Gao JI, Matsuda Y. Effects of Mixer and Mixing Time on the Pharmaceutical Properties of Theophylline Tablets Containing Various Kinds of Lactose as Diluents. *Drug Dev Ind Pharm.* januar 1993;19(3):333–48.
52. Brown CK. Dissolution Method Development: An Industry Perspective. I: *Pharmaceutical Dissolution Testing*/edited by Jennifer Dressman, Johannes Krämer. Taylor & Francis; 2005. s. 351–72.
53. Mann J, Hermans A, Contrella N, Nickerson B, Coutant CA, Jede C, mfl. Dissolution Method Troubleshooting: An Industry Perspective. *Dissolution Technol.* 2022;29(4):190–203.
54. Shiko G, Gladden LF, Sederman AJ, Connolly PC, Butler JM. MRI Studies of the Hydrodynamics in a USP 4 Dissolution Testing Cell. *J Pharm Sci.* mars 2011;100(3):976–91.
55. Eaton JW, Tran D, Hauck WW, Stippler ES. Development of a Performance Verification Test for USP Apparatus 4. *Pharm Res.* februar 2012;29(2):345–51.
56. Sinko PJ. Drug release and dissolution. I: *Martin's Physical Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 5. utg. Lippincott Williams & Wilkins; 2006. s. Kap. 13.
57. Butler J, Hens B, Vertzoni M, Brouwers J, Berben P, Dressman J, mfl. In vitro models for the prediction of in vivo performance of oral dosage forms: Recent progress from partnership through the IMI OrBiTo collaboration. *Eur J Pharm Biopharm.* mars 2019;136:70–83.
58. Andreas CJ, Rosenberger J, Butler J, Augustijns P, McAllister M, Abrahamsson B, mfl. Introduction to the OrBiTo decision tree to select the most appropriate in vitro methodology for release testing of solid oral dosage forms during development. *Eur J Pharm Biopharm.* september 2018;130:207–13.
59. 2.9.3. Dissolution test for solid dosage forms. I: *European Pharmacopoeia.* 11. utg. European Pharmacopoeia Commission; 2023.
60. Ashford M. Bioavailability- physiochemical and dosage form factors. I: *Aulton's.*
61. Gray VA. *Compendial Testing Equipment: Calibration, Qualification, and Sources of Error.* I: *Pharmaceutical Dissolution Testing*/edited by Jennifer Dressman, Johannes Krämer. Taylor & Francis; 2005.
62. Reppas C, Vrettos NN, Dressman J, Andreas CJ, Miyaji Y, Brown J, mfl. Dissolution testing of modified release products with biorelevant media: An OrBiTo ring study using the USP apparatus III and IV. *Eur J Pharm Biopharm.* november 2020;156:40–9.
63. D'Arcy DM, Liu B, Corrigan OI. Investigating the effect of solubility and density gradients on local hydrodynamics and drug dissolution in the USP 4 dissolution apparatus. *Int J Pharm.* oktober 2011;419(1–2):175–85.

64. Fotaki N. Flow-Through Cell Apparatus (USP Apparatus 4): Operation and Features. *Dissolution Technol.* 2011;18(4):46–9.
65. Dressman JB, Krämer J, redaktører. *Pharmaceutical dissolution testing*. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005. 22 av 429.
66. Kakhi M. Classification of the flow regimes in the flow-through cell. *Eur J Pharm Sci.* juli 2009;37(5):531–44.
67. Bhattachar SN, Wesley JA, Fioritto A, Martin PJ, Babu SR. Dissolution testing of a poorly soluble compound using the flow-through cell dissolution apparatus. *Int J Pharm.* april 2002;236(1–2):135–43.
68. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. *Kromatografi- Separasjon og deteksjon*. Universitetsforlaget; 2005.
69. Kazakevich Y, LoBrutto R. Introduction. I: Kazakevich Y, LoBrutto R, redaktører. *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [Internett]. 1. utg. Wiley; 2007 [sitert 26. september 2023]. s. 1–24. Tilgjengelig på:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470087954.ch1>
70. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG, redaktører. *Introduction to chromatography. I: Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition*. Hoboken, NJ: Wiley; 2019. s. 347–77.
71. Greibrokk T, Lundanes E, Rasmussen KE. *Væskrokromatografi (HPLC). I: Kromatografi- Separasjon og deteksjon*. Universitetsforlaget; 2005. s. 173.
72. Meyer VR. *Practical high-performance liquid chromatography*. Hoboken, N.J.: Wiley; 2013.
73. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG, redaktører. *Separation Principles in Liquid Chromatography. I: Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition*. Hoboken, NJ: Wiley; 2019. s. 378–427.
74. Kazakevich Y, LoBrutto R. Stationary Phases. I: Kazakevich Y, LoBrutto R, redaktører. *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [Internett]. 1. utg. Wiley; 2007 [sitert 26. september 2023]. s. 75–138. Tilgjengelig på:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470087954.ch3>
75. LoBrutto R. Method Development. I: Kazakevich Y, LoBrutto R, redaktører. *HPLC for Pharmaceutical Scientists* [Internett]. 1. utg. Wiley; 2007 [sitert 26. september 2023]. s. 347–454. Tilgjengelig på: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470087954.ch8>
76. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. *Legemiddelanalyse. 2. utg*. Bergen: Fagbokforlaget; 2010. 162–231 s.

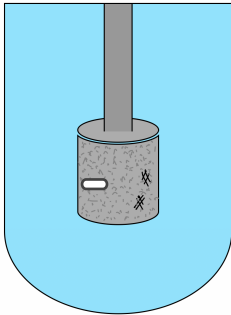
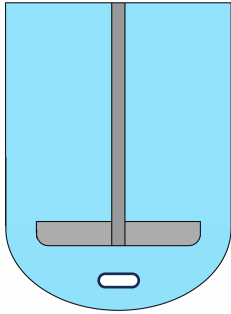
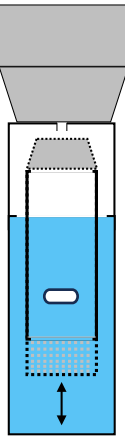
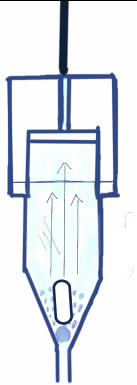
77. Kazakevich Y. HPLC Theory. I: Kazakevich Y, LoBrutto R, redaktører. HPLC for Pharmaceutical Scientists [Internett]. 1. utg. Wiley; 2007 [siteret 26. september 2023]. s. 25–74. Tilgjengelig på: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470087954.ch2>
78. Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition- Concepts and Workflows. © Agilent Technologies, Inc.; 2012.
79. Erweka Instruction Manual USP 4 Flow-Through Cell DFZ II. Erweka; 2017.
80. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG, redaktører. Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition. Hoboken, NJ: Wiley; 2018. 131–203, kap. 4 s.
81. Mishra P, Pandey C, Singh U, Gupta A, Sahu C, Keshri A. Descriptive statistics and normality tests for statistical data. *Ann Card Anaesth.* 2019;22(1):67.
82. Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen KE. Legemiddelanalyse. 2. utg. Bergen: Fagbokforlaget; 2010. 93–108 s.
83. Popl M, Fähnrich J, Tatar V. Chromatographic analysis of alkaloids. New York: M. Dekker; 1990. 81 s. (Chromatographic science).
84. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG, redaktører. Fundamentals of Pharmaceutical Analytical Chemistry. I: Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition. Hoboken, NJ: Wiley; 2018. s. 131–204.
85. Bliesner DM. Validating chromatographic methods: a practical guide. Hoboken, N.J.: Wiley; 2006. 1–55 s.
86. ICH Q2(R2) Validation of analytical procedures - Scientific guideline [Internett]. European Medicines Agency (EMA); 2006. Tilgjengelig på: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology-step-5_en.pdf)
87. HARMONISED GUIDELINES FOR THE USE OF RECOVERY INFORMATION IN ANALYTICAL MEASUREMENT [Internett]. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC); 1998. Tilgjengelig på: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/recovery.pdf>
88. Pedersen-Bjergaard S, Gammelgaard B, Halvorsen TG, redaktører. Introduction to pharmaceutical analytical chemistry. Second edition. Hoboken, NJ: Wiley; 2018. 625–673 s.
89. Jójárt I, Sovány T, Pintye-Hódi K, Kása P. Study of the behaviour of magnesium stearate with different specific surface areas on the surface of particles during mixing. *J Adhes Sci Technol.* 1. desember 2012;26(24):2737–44.



## Appendiks 1

### Supplement til kapittel 1.6.1: Metoder for in vitro frisettingstester

**Tabell 1:** Kortfattet beskrivelse av de fire offisielle apparatene som er beskrevet i den europeiske og amerikanske farmakopé for FST av tabletter og kapsler (1–4). (Tegning tilpasset)

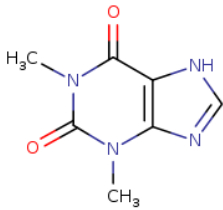
Apparat	Illustrasjon	Navn fra Ph Eur og beskrivelse
1		<p><b>Basket apparatus</b></p> <p>Doseringsenheten som skal testes (f.eks. tablett) er plassert i kurv med bestemt rotasjonshastighet. Kurven er senket i en beholder med et fastsatt volum av oppløsningsmedium.</p>
2		<p><b>Paddle apparatus</b></p> <p>Doseringsenheten som skal testes (f.eks. tablett) plasseres i en beholder med fastsatt volum oppløsningsmedia. Beholderen har en padleåre som roterer med bestemt hastighet.</p>
3		<p><b>Reciprocating cylinder</b></p> <p>Doseringsenheten plasseres i en glassylinder som senkes ned i en beholder med oppløsningsmedium med en regulert takt. Oppløsningsprosessen skjer ved at oppløsningsmedia strømmer inn gjennom en gitterstruktur i glassylinderen hver gang den senkes ned i beholderen</p>
4		<p><b>Flow-through cell</b></p> <p>Doseringsenheten plasseres i en glasscelle. Oppløsningsmedia pumpes kontinuerlig gjennom cellen (fra bunnen) med bestemt hastighet.</p>

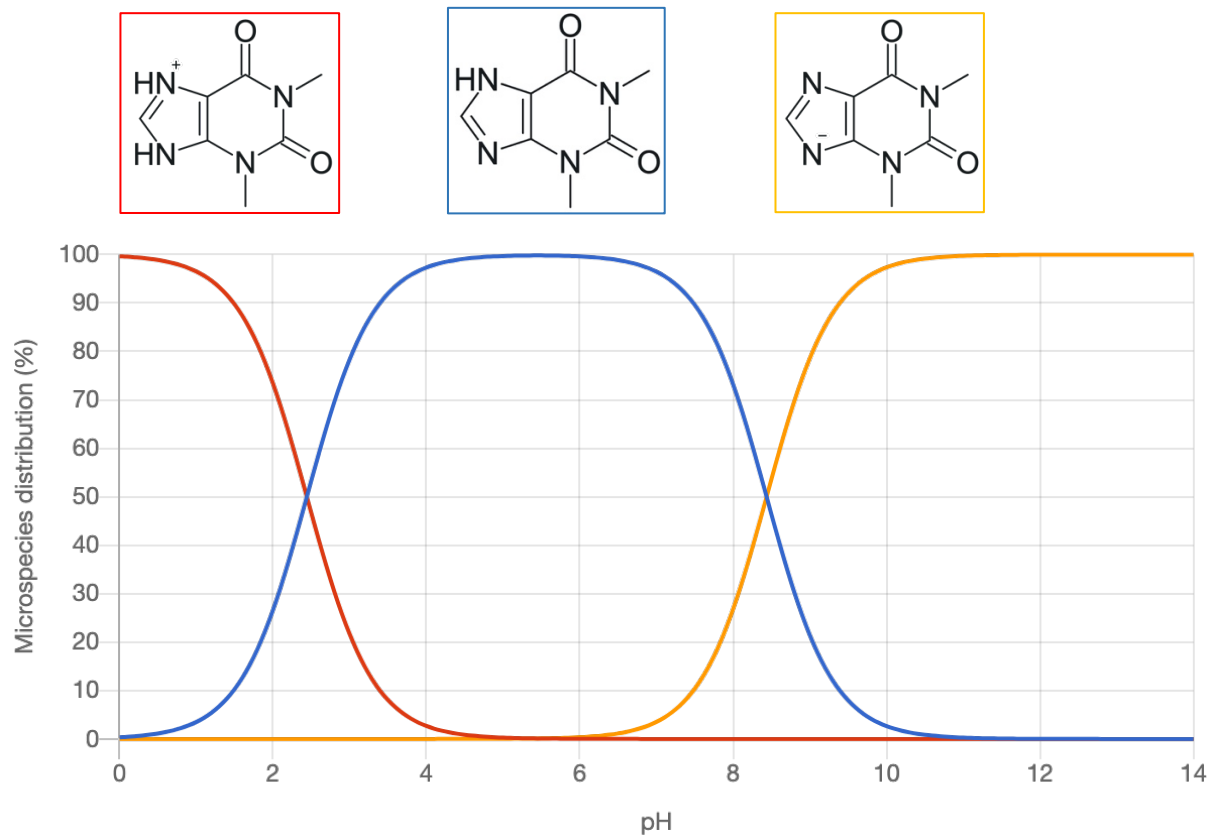
--	--	--

## Appendiks 2

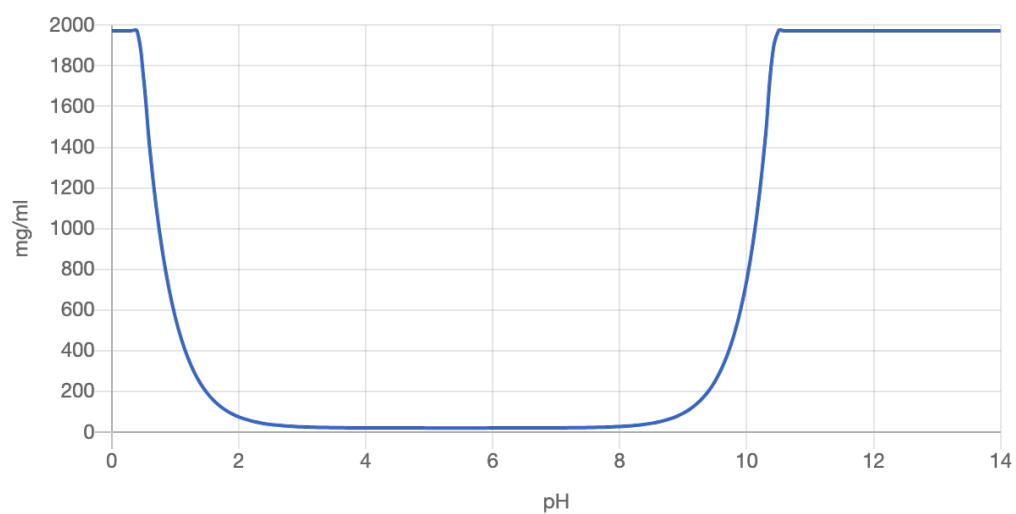
Supplement til kapittel 1.5 Theo-Dur og kapittel 2. Material og metode

**Tabell 2:** Sammendrag av fysikalsk-kjemiske egenskaper til teofyllin (anhydrat).

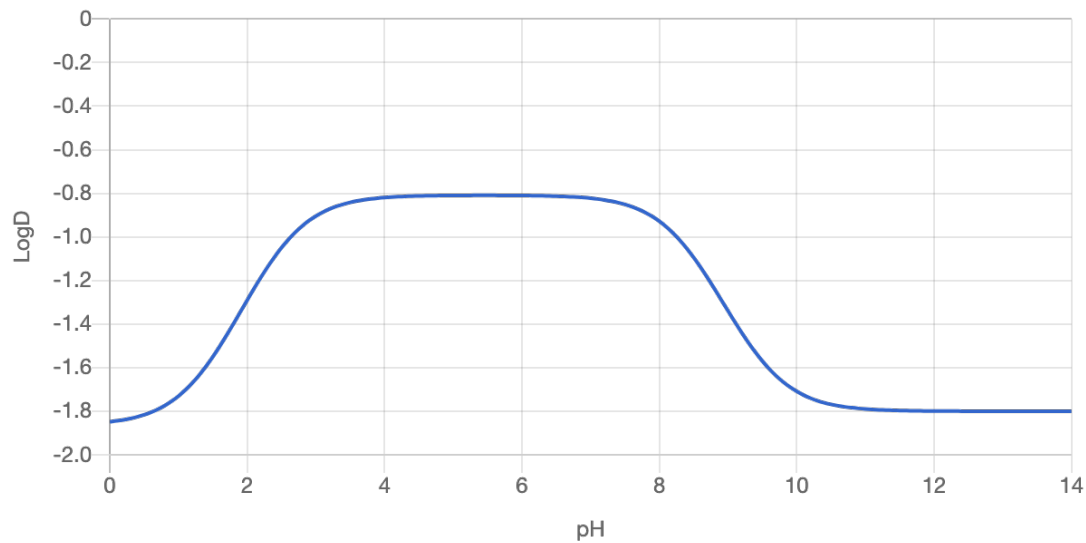
Fysikalsk-kjemiske egenskaper	Beskrivelse
Molekylstruktur (5)	
Molar masse (6)	180,16 g/mol
pKa (6)	8,81
LogP (6)	-0,02
Løselighet i vann (7)	8,3 mg/mL
Absorpsjon i GIT (8)	Raskt og fullstendig, BCS-klasse 1 (9)



**Figur 1:** Diagram som viser en prediksjon for hvilken ionisert form av teofyllin som dominerer ved likevekt som funksjon av pH (hentet fra og kalkulert i dataprogrammet Chemicalize) (5)



**Figur 2:** Diagram som viser forventet intrinsisk løselighet til teofyllin ved ulike pH (hentet fra og kalkulert i Chemicalize) (5).



**Figur 3:** Predikert hydrofobisitet til teofyllin som funksjon av pH (hentet fra og kalkulert i Chemicalize) (5)

**Theo-Dur® depottabletter** (Karo Pharma AB)

Virkestoff: Teofyllin

Hjelpestoffer (8,10):

- Laktose
- Sukkerkuler 105 mg (stivelse 10-40%, sakkarose 60-85%)
- Hypromellose
- Magnesiumstearat
- Glyserolmonostearat
- Hvit voks
- Cetylalkohol
- Myristylalkohol
- Celluloseacetatftalat
- dietylftalat



## Appendiks 3: Troubleshooting HPLC

### *Tiltak etter håndteringsanalyse 2*

Her beskrives tiltak og forsøk som ble utført som følge av resultatene etter håndteringsanalyse 2 (se metodekapittel 3.1.4 og resultatkapittel 4.1.4). HPLC-kolonnen: Poroshell 120, SB-C18-kolonnen, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale.

Forurensning/urenheter ble vurdert som mest sannsynlig årsak fordi dette også kan blokkere for gjennomstrømning av mobilfasen og føre til økt trykk i HPLC-systemet. Derfor ble HPLC-kolonnen forsøkt rensed med metanol med mobilfasehastighet 0,6 ml/min (ca 1 time). Hensikten var om mulig å få skylt ut eventuelle urenheter fra kolonnen. Etter dette ble standardløsningene fra håndteringsanalyse 2 re-analysert. Kromatografiske betingelser var som beskrevet for håndteringsanalyse 1 og 2. Dette ga ytterligere forverring av økt trykk i HPLC og «dårlige» kromatogrammer. Derfor ble det forsøkt å skylle HPLC-kolonnen og systemet med sterkere organiske løsemidler enn metanol.

Omfattende rensing i flere omganger ble iverksatt i samarbeid med Einar Egeland. HPLC-kolonnen ble skylt gjennom med et trinnvis bytte til sterkere organisk løsemiddel (se figur 4).



**Figur 4:** Prosedyre utført for rensing av RP-HPLC kolonne

Heksan var sterkeste løsemiddel. Blandbarhet av de organiske løsemidlene var årsaken til dette gradvise bytte av løsemidler. Slik sikret man at løsemidlene var i stand til å skylle ut det foregående løsemidlet som var brukt. For eksempel er ikke metanol og heksan blandbare (11). Hvert trinn i renseprosedyren varte i 5-10 minutter, og hastighet på mobilfase var 1 ml/min. Mellom hvert løsemiddelbytte ble luftbobler fjernet (v/åpning av ventil) for å ikke få luft i kolonnen. For hver runde med rensing av kolonnen ble renseprosedyren ble utført to ganger. Etter rensing var dessverre like høyt/høyere. Det ble da testet ny forkolonnen, siden ingen mekaniske deler i HPLC-instrumentet så ut til å forårsake trykkøkningen. Trykket stabiliserte seg på et lavere nivå etter bytte av forkolonnen. Deretter ble det diskutert om håndteringsanalyse 2 skulle repeteres før analyse av «ekte prøver» fra oppløsningstest av

depottablett. Repetisjon av håndteringsanalyse 2 ble ikke prioritert fordi det hadde gått med mye tid til trykk-utfordringene.

Preliminær oppløsningstest av depot-tablett i apparat 4 og forsøk på analyse av prøver i HPLC (isokratisk metode)

I dette forsøket var formålet å undersøke hvordan elueringsmetoden (83% vann og 17% metanol) håndterte prøver fra FST med depottablett i apparat 4. Disse prøvene inneholder både teofyllin og hjelpestoff fra depottabletten. Her ønsket vi å sjekke at analysemetoden håndterte prøver med et mer sammensatt innhold og at signal fra teofyllin ble detektert.

### Metodebeskrivelse

FST ble utført med 1 stykk hel depottablett (Theo-Dur® 300 mg depottablett, BioPhausia, LOT: 63326C, utl.dato: 11/2020) i apparat 4. Depottabletten ble håndtert som beskrevet i kapittel 2.3.3 *Hele og delte depottabletter*. Oppsett av FTC var med *Tablettcelle* i kapittel 2.2.1, med unntak av at det i denne FST ble depottablett plassert i tablettcelle med 1,0 g glasskuler under og 1,0 g glasskuler over. Varighet og prosessparameterne for første FST er beskrevet i tabell 3.

**Tabell 3:** Oversikt over et utvalg av prosessparameterne til første FST med Theo-Dur depottablett i apparat 4. Testen varte i 120 minutter på grunn av mangelsituasjonen på rensed vann.

Antall	Varighet av intervall [min]	Flow-rate [ml/min]	Kumulativ varighet [min]	Simulert region av GIT
2	10	8	20	Magesekk (fastende)
10	10	4	100	Tynntarm (fastende)

Prøvene fra hvert tidsintervall i FST ble filtrert gjennom et sprøytefilter (GHP-membran 25 mm diameter, 0,45 µm porestørrelse, Acrodisc®). Det ble brukt 5 mL målesprøyte og ca 1 mL filtrat ble overført til hver HPLC-prøvebeholder, påført skrutopp og plassert i HPLC. Samme sprøyte og sprøytefilter ble brukt til alle prøvene i den første FST. Samme sprøytefilter ble brukt i filtrering av alle prøvene, og de første 4 mL av filtrat ble forkastet før overføring til HPLC-prøvebeholder. Prøvene ble forsøkt analysert i HPLC med isokratisk

eluent. HPLC-kolonne: Poroshell 120, SB-C18-kolonne, 4,6 x 100 mm, 2,7 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale.

## **Resultat**

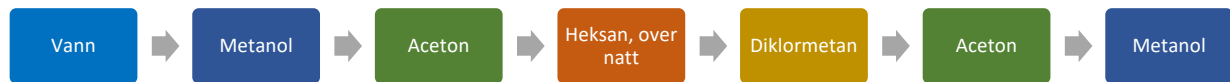
Ingen kromatografiresultater ble oppnådd i dette forsøket, da trykket oversteg grenseverdiene for systemtrykk (innstilt til 400 bar, OpenLab ChemStation, Agilent) etter injeksjonen av første prøve.

## **Diskusjon og konklusjon av dette forsøket**

For å lokalisere årsak til trykkproblemene ble det utført en systematisk kartlegging av trykk i ulike HPLC-komponenter (utført i samarbeid med Egeland). Kartleggingen viste at årsaken trolig var tett forkolonne og tett analysekolonne, som stemmer overens med at trykkøkning er vanligste symptom på svikt i HPLC-kolonnen (12). For å redde analysekolonnen ble ulike renseprosedyrer forsøkt.

Theo-Dur® depot-tabletter inneholder hjelpestoffer med stor variasjon i egenskaper, fra veldig upolar voks til mer vannløselige, men store cellulosepolymerer (8). Disse hjelpestoffene kan bli sittende fast i HPLC-kolonnen. Svært upolare hjelpestoffer blir sittende fast på grunn av sterk affinitet til stasjonærfasen. Disse lar seg vanskelig skylle ut av kolonnen hvis styrken på mobilfasen er for polar. Store cellulosepolymerer og andre polymerer kan bli sittende fast på grunn av molekylstørrelsen. Polymerer kan antakeligvis komme seg inn i kolonnen på grunn av en viss fleksibilitet i polymerkjeden. Men disse kan være vanskelig å få transportert gjennom og ut av kolonnen. I forsøket ble det brukt en svært finpartikulær kolonne (2,7 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale) som øker risikoen for at polymere forbindelser blir sittende fast.

Fordi det var stor variasjon i hjelpestoffenes egenskaper ble det utført en mer sammensatt renseprosedyre av HPLC-kolonne og system (se figur 4 og figur 5) enn beskrevet tidligere. Denne ble utviklet i samråd med Egeland og veileder Zeiss.



**Figur 5:** Utvidet prosedyre for rensing av RP-HPLC-kolonne.

Renseprosedyren (figur 5) ble gjentatt flere ganger i et forsøk på å redde HPLC-kolonnen. «Baklengs spyling» (engelsk; backflushing (12)) av kolonnen med løsemidlene ble gjort som et siste forsøk på å få fjernet det som satt fast. Når dette ikke ga bedring, ble kolonnen erklært ødelagt.

Ny analytisk kolonne til HPLC ble bestilt. Denne var av typen ACE 5 C<sub>18</sub>, 4,6 mm x 250 mm, 5µm partikkelstørrelse på pakkematerial, prod.nr: ACE-121-2546 og tilhørende forkolonne (også ACE). Valget var basert på at en mindre finpartikulær kolonne ville være mer mindre sårbar for å gå tett (12), og var drøftet med Egeland.

Fordi utfordringer med kolonnen (Poroshell) oppsto før analyse av prøver etter FST fra depot-tablett, ble også andre årsaker enn hjelpestoffer diskutert:

- Støv/partikkelforurensing fra omgivelser til mobilfase eller prøver:
  - o Ved tillaging av løsninger med teofyllin.
  - o Ved etterbehandling av prøver og teofyllinløsninger.
  - o Slitasje på gummipakninger i HPLC-apparat; gummipartikler følger med mobilfasen.
  - o Eldre skrukorker med gummiseptum (anslagsvis mellom 7 og 12 år gamle).
- Teofyllin monohydrat (Tromsø, 2014).
  - o Renhet og kvalitet var ukjent.
  - o Mulighet for problematiske degraderingsprodukter
  - o Ikke-optimale lagringsbetingelser (transparent plastpose, med zip-lukkefunksjon).
- Tillaging, behandling og analyse av teofyllinløsninger (fra teofyllin monohydrat):
  - o Små mengder uopløst stoff i prøver som ble analysert. Dette kan være vanskelig å detektere i målekolbe ved visuell kontroll.
  - o For lite tid mellom analyse av hver prøve, og stadig akkumulasjon av teofyllin i kolonne.

Tabell 4 (se neste side): En kort oppsummering fra litteratursøk i forbindelse med innkjøp av ny HPLC-kolonne. Det ble søkt databasene Pubmed og Google Scholar.

**Tabell 4**

<b>Forfattere</b>	<b>Hovedelementer i studien</b>	<b>Opprinnelse til løsning i prøver</b>	<b>Prøveopparbeidelse</b>	<b>HPLC-kolonne (stasjonærfase, dimensjon og partikkelstørrelse)</b>
Abdelaleem et al (2015)(13)	HPLC metode for bestemmelse av av paracetamol og pamabrom, samt mulige urenheter.	Løsning fra knuste tablett	Sonikert og filtrert	C8, 4,6 µm
Marzouk et al (2020) (14)	RP-HPLC-metode for bestemmelse av ergotamin, koffein, paracetamol og metoklopramid fra Metograin tablett.	Løsning fra knuste tablett	Sonikert og filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 250x4,6 mm, 5.0 µm
Zarmpi et al (2020) (15)	FST: undersøke hjelpestoffers påvirkning på frisetting av karbamazepin og paracetamol	Løsninger fra FST av produserte tablett	Filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 250x4,6 mm, 5.0 µm
Abdel-Hay et al (1992) (16)	Bestemmelse av guaifenesin og teofyllin i laboratoriepreparerte kapsler	Løsning fra knuste kapsler	Filtrert gjennom filterpapir (ukjent type, og porestøttelse)	C18, 250x4,6 mm, 5.0 µm
Vu Dang et al (2020) (17)	Bestemmelse av ibuprofen, paracetamol og koffein fra orale faste doseringsformer	Løsning fra knuste tablett og kapsler	Filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 150x 4,6 mm, 5.0 µm
Davydova et al (2010) (18)	Validering av FST av kosttilskudd, undersøke frisatt mengde vitamin A	FST av tablett	Filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 100 x 4,6 mm, 3 µm
Menegola et al (2007) (19)	FST og sammenligning av frisettingsprofil fra ulike tablett med citalopram	FST av tablett	Sentrifugert og filtrert (porestørrelse 0.45 µm og 0.3 µm).	C18, 250x4,6 mm, 5.0 µm
Chaibva og Walker (2012) (20)	FST av depottablett (sustained release) med salbutamol, undersøkelse av frisetting basert på type og mende polymerer	FST depottablett	Filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 150x 4,6 mm, 5.0 µm
Tian et al (2008) (21)	FST og undersøkelse av mengde venlafaksin i pellets med modifisert frisetting (sustained release)	Undersøkelse av mengde venlafaksin i pellets med funksjonell filmdrasjering	Sonikert, fortynnet og filtrert (porestørrelse 0.45 µm).	C18, 150x 4,6 mm, 5.0 µm

Forsøk på å fortsette metodeutviklingen med alternativ HPLC-kolonne

I påvente av ny RP-HPLC-kolonne, ble den ødelagte kolonnen erstattet med en annen tidligere brukt HPLC-kolonne (Eclipse Plus C18, Agilent, prod.nr: 959961-902, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm partikkelstørrelse på pakkemateriale). Tanken var å fortsette metodeutviklingen og HPLC-analyser med denne kolonnen som en midlertidig løsning. Dette skulle sørge for fortsatt fremgangen i prosjektarbeidet. Hensikten med forsøkene var å sjekke om den isokratiske elueringsmetoden (83% vann og 17% metanol) fungerte på denne kolonnen eller om mobilfasesammensetningen måtte justeres. Fra forsøkene var det forventet å raskt få på plass en fungerende isokratisk elueringsmetode.

### **Metodebeskrivelse**

For hver uke ble det laget en serie standardløsninger (2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L og 20 mg/L, (se kapittel 2.1.4 *teofyllin monohydrat*). Standardløsningene ble filtrert gjennom sprøytefilter (Acrodisc ®, 45 µm porestørrelse). Første 4 mL filtrat ble forkastet, og siste 1 mL ble overført til HPLC-prøvebeholder og plassert i HPLC. Prøvene ble analysert uten skrutopp på prøvebeholder.

Først ble en prøveserie (standardløsninger med 4 ulike konsentrasjoner) analysert med isokratisk elueringsmetode (83:17, vann:metanol). Deretter ble elueringsmetoden forsøkt endret og optimalisert ved å analysere prøveserien med endring i kromatografiske betingelser. Disse var endring av sammensetningen til mobilfasen (vann:metanol), injeksjonsvolum og hastighet på mobilfasen. Det ble også undersøkt om man fikk samme resultater ved å repetere analysen av samme prøve under samme betingelser.

### **Resultater og diskusjon**

Flere utfordringer gjorde at metodeutviklingen med denne kolonnen ble problematisk. De største utfordringene var drift i baselinja, spøkelsestopper, asymmetriske topper, og splittede topper. Et kritisk problem var at vi ikke fant forsøksbetingelser som gav reproducerbare resultater når samme prøve ble re-analysert. Det ble også undersøkt i litteraturen om teofyllin kunne gi problematiske nedbrytningsprodukter eller hadde utpregede stabilitetsproblemer. Funnene peker mot at teofyllin ikke har utpregede stabilitetsproblemer under de eksperimentelle forholdene som hittil har vært tilfelle i prosjektet med tanke på rent teofyllin løst i rensset vann (22). En studie viser at nedbrytingen av teofyllin er liten, selv under relativt harde betingelser (23).

Til slutt ble det sammen med Egeland utført diverse teknisk vedlikeholdsarbeid av HPLC-apparat utført. Blant annet utskifting av pumpefilter (se bilde 1) og ulike renseprosedyrer. Da ingen av tiltakene resulterte i noen forbedring, ble utviklingsarbeidet satt på pause til den nye HPLC kolonnen (ACE) ankom. Av samme grunn er ikke disse forsøkene beskrevet mer utdypende i oppgaven.

Flere forebyggende tiltak ble iverksatt som en konsekvens av utfordringene beskrevet hittil i oppgaven. Det ble kjøpt inn nye materialer og kjemikalier. Innkjøp av organiske løsemidler av høy kvalitet (Metanol EMSURE® fra Sigma- Aldrich, Etyl acetat VWR® fra BDH Chemicals, Heksan LiChrosolv® fra Sigma-Aldrich), Teofyllin anhydrat ( $\geq 99\%$  teofyllin, fra Sigma- Aldrich) til stamløsninger og andre teofyllinoppløsninger og ny pakning med Theodor® 300 mg depot-tabletter (KARO pharma®, LOT: 2105001A) av ble gjort. Vi kunne ikke utelukke at analyseproblemene skyldtes kvaliteten eller tilstanden til kjemikaliene som hittil var brukt i prosjektet. For eksempel var det ikke brukt organiske løsemidler av HPLC-kvalitet, verken som eluent eller i renseprosedyrene. Byttingen av pumpefilteret i HPLC-instrumentet viste betydelig misfarging (se bilde 1), noe som kan tenkes å være et tegn på utfordringer knyttet til renheten av de løsemidlene som er brukt i mobilfasen. Men om dette er tilfelle for vår del, er ikke bekreftet.



**Bilde 1:** Ved bytte av pumpefilter ble det gamle pumpefilteret (til venstre) sammenlignet med nytt pumpefilter (til høyre).



Innkjøp av sprøytefilter med mindre porestørrelse (CA-membran, 25 mm diameter, 0,22 µm porestørrelse, VWR®) ble gjort for å få med minst mulig uoppløste komponenter depottabletten med i prøvene fra FST.

Videre endret vi rutine for etterbehandling av løsninger og prøver med teofyllin prøveopparbeidelse til: Filtrering av alle prøvene gjennom sprøytefilter (CA-membran, 0,22 µm porestørrelse) før HPLC-analyse, inklusive standardløsningene. Sonikering (VWR™ Ultrasonic Cleaner, USC500T) av løsningene laget av teofyllin anhydrat (se kapittel 2.1.2 og 2.1.3) og løsningene laget av depottabletter (se kapittel 2.1.6 *Løsning 1, 2 og 3*). Andre tiltak som ble iverksatt var bruk av avtrekksskap for tillaging av løsninger, håndtering av prøver og overføring av løsemidler til HPLC-beholder for mobilfase. Hensikten var å redusere risiko for at partikler fra omgivelsene skulle påvirke HPLC-analysen. For eksempel tette kolonnen. Filtrering (filter med SFCA-membran, 0,22 µm porestørrelse og filter med PA-membran 0,45 µm porestørrelse) av løsemidlene før overføring til HPLC-beholder for mobilfase ble også iverksatt. Etylacetat og rensert vann (vannrensesystem smart2pure pro, Thermo Scientific) ble ikke filtrert. Det ble videre bestemt å forsøke gradient elueringsmetode for videre testanalyser og metodeutvikling.

Før installering og bruk av ny kolonne (ACE) ble arbeidsområdet vasket og støv fjernet. Videre ble diverse vedlikeholdsarbeid på HPLC-apparatet utført med hjelp av Egeland. HPLC-pumpe ble demontert og komponentene undersøkt for slitasje og skader (Egeland). Pumpefilter ble tatt ut og inspisert på grunn av diskusjonen omkring «renheten» til de organiske løsemidlene som tidligere ble brukt i HPLC. Pumpefilteret var blitt betydelig misfarget etter kun 2-3 ukers bruk. Dette pumpefilteret ble senere sammenlignet med det pumpefilteret som ble satt inn, etter et halvt års hyppig bruk men med organiske løsemidler av HPLC kvalitet som mobilfase (se bilde 2). Gummipakningene (eng; plunger seals) ble også sjekket, men ikke tatt ut fordi vi manglet nye pakninger til å erstatte de med. Komponentene ble vasket i aceton før pumpa ble skudd sammen igjen.

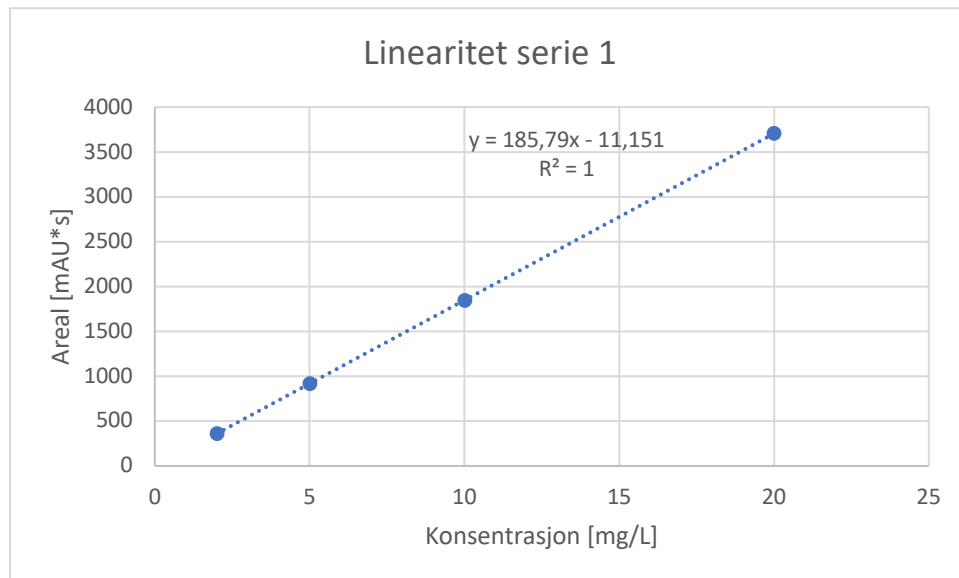


**Bilde 2:** Til venstre i bildet er et brukt og et nytt pumpefilter til HPLC plassert side ved side. I bildet vises en tydelig fargedifferanse mellom det pumpefilter som har vært i kontakt med mobilfase (lengst til venstre) og det ubrukte pumpefilteret (til høyre for brukt pumpefilter). Bildet er tatt i forbindelse med demontering og acetonbad av komponenter tilhørende pumpe til HPLC-apparat.

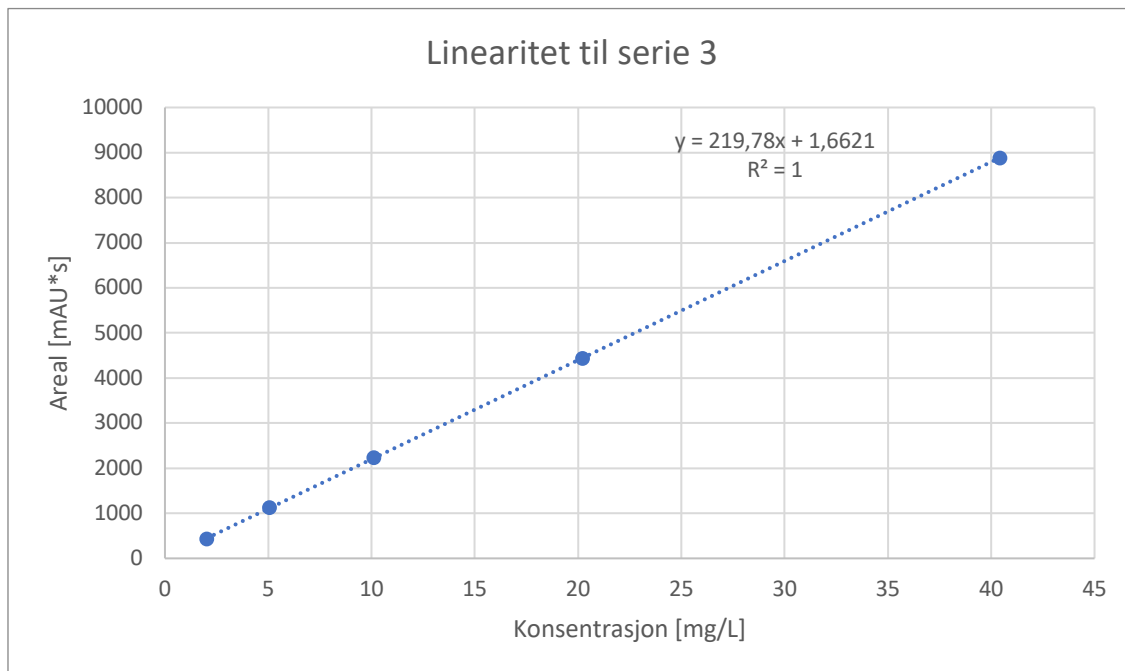
Etter endt laboratoriearbeid i forbindelse med masterprosjektet ble gummipakningene byttet. De gamle pakningene ble da undersøkt, og ingen skader som skulle tilsi at løsnede gummipartikler/fragmenter skulle ha forekommet under pakningens brukstid.

## Appendiks 4

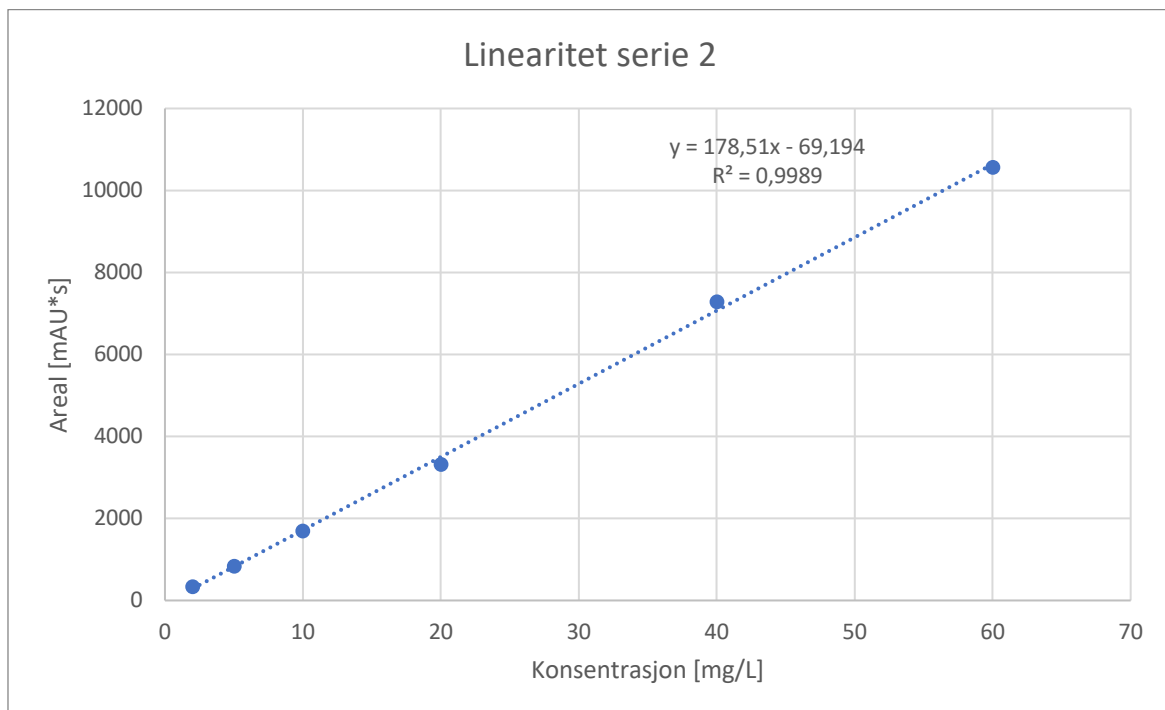
Supplement til resultater, kapittel 4.2.2. Etablering av lineært måleområde og kalibrering av HPLC (gradient elueringsmetode)



**Figur 6:** Regresjonskurve fra undersøkelse av linearitet til første standardserie av teofyllin analysert i HPLC med gradient elueringsmetode. Konsentrasjonsområdet var 2 mg/L -20 mg/L (se metodebeskrivelse forsøk 3.3.2).



**Figur 7:** Regresjonskurve fra undersøkelse av linearitet til standardserie av teofyllin analysert i HPLC med gradient elueringsmetode. Konsentrasjonsområdet var 2,02 mg/L -40,4 mg/L.



**Figur 8:** Regresjonskurve fra undersøkelse av linearitet til standardserie av teofyllin analysert i HPLC med gradient elueringsmetode. Konsentrasjonsområdet var 2 mg/L -60 mg/L.

## Appendiks 5: FST i apparat 4

Supplement til kapittel 4.2.3. Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett (uten fortytning) og og kapittel 4.2.5 FST i granulat -og pulvercelle

**Tabell 5:** Areal målt i prøvene fra FST av hel, delt og ulik grad av knust uten fortytning, samt areal fra FST med depottablett knust til homogen pulverblanding i granulat -og pulvercelle (se resultater 4.2.5).

Prøve (nr)	Areal [mAU*s]					
	Hel	Hel, repetert	Delt	Forsiktig knust	Knust til homogen pulver	Forsøk m/ granulat -og pulvercelle
1	14122,3	17413,4	17113,8	42522,7	44881,3	50889,8
2	7574,8	9299,7	11274,8	28983,0	35288,1	26300,7
3	10547,4	13280,7	14970,0	29053,4		13828,5
4	9956,2	12927,6	13607,9	26815,2		7821,0
5	8509,3	10559,7	12986,6	25482,7		5818,8
6	8432,9	8064,9	13500,8	24745,6		4247,9
7	7803,9	8539,2	13185,4	20751,9		3384,0
8	7220,8	7931,0	13286,4	16121,5		2537,8
9	6868,5	8630,0	13861,7	16121,5		1545,6
10	7013,7	10404,0	16676,3	7379,5		1266,0
11	8111,3	11022,1	11835,9	6141,8		879,9
12	7817,7	10158,1	9380,0	4080,0		815,9
13	8464,4	11255,6	9007,6	3416,3		628,8
14	7619,3	9924,4	8710,9	2933,3		468,5
15	7512,0	12636,4	9222,5	2296,8		561,1
16	7232,4	15121,4	8794,0	1795,5		410,7
17	6914,0	10623,3	9866,1	1440,9		621,9
18	6689,8	9952,4	8672,9	1244,8		406,0

Supplement til kapittel 4.2.4 Frisettingstester i apparat 4, av hel, delt og knust depottablett med fortynning av prøvene

**Tabell 6:** Følgende kalibreringskurve (06.01.2023) var tilknyttet forsøkene *Frisettingstester i apparat 4 av hel, delt og knust depottablett med fortynning av prøvene*, og benyttet til konsentrasjonsberegning av teofyllin i prøver.

Konsentrasjon [mg/L]	Areal, gjennomsnitt [mAU*s]	Standardavvik [mAU*s]	Relativt standardavvik (RSD) [prosent]	Regresjonsligning og regresjonskoeffisient (R <sup>2</sup> )
2,02	432,2	2,656	0,614	y = 219,78x + 1,6621 R <sup>2</sup> = 1
5,05	1121,2	3,1453	0,281	
10,1	2234	6,093	0,273	
20,2	4431,1	12,327	0,278	
40,4	8882,1	25,738	0,290	

**Tabell 7:** Areal målt i prøvene fra FST av hel og delte depottabletter med fortynning av prøvene før analyse i HPLC.

Prøve [nr]	Hel		Delt		Delt	
	Areal [mAu*s]	Fortynningsfaktor	Areal [mAu*s]	Fortynningsfaktor	Areal [mAu*s]	Fortynningsfaktor
1	5238,1	4	10692,96973	2,5	6214,8	4
2	2978,4	4	5295,97949	2,5	3264,2	4
3	3922,9	4	5683,02832	2,5	4153,3	4
4	3249	4	5153,8457	2,5	3984	4
5	2816,9	4	4546,64111	2,5	4012,2	4
6	2710,4	4	5456,125	2,5	4350,2	4
7	2868,8	4	6418,38232	2,5	4988,5	4
8	2946,4	4	6400,93994	2,5	4973,5	4
9	3498,9	4	5757,0249	2,5	6172,4	4
10	3662,5	4	5707,79443	2,5	6304,8	4

11	3781,9	4	5220,08105	2,5	4423,8	4
12	4707,8	4	5185,49463	2,5	4214,8	4
13	3743,7	4	4764,46582	2,5	3522,7	4
14	3383,6	4	4510,33057	2,5	3406,7	4
15	3376,5	4	4590,13379	2,5	2893,7	4
16	2961,3	4	6000,72021	2,5	2759,5	4
17	3038,6	4	7105,02539	2,5	3516,4	4
18	2928,8	4	7105,02539	2,5	2983,6	4

Supplement til kapittel 4.2.6 Frisettingstest i apparat 4 av knust depottablett i granulat -og pulvercelle med fortynning av prøver

**Tabell 8:** Areal målt i prøvene fra FST av knust depottablett med fortynning av prøvene før analyse i HPLC.

Prøve [nr]	Knust, granulat -og pulvercelle	Fortynningsfaktor
	Areal [mAu*s]	[]
1	24505,2	10
2	4187,6	10
3	982,3	10
4	1032,2	2,5
5	726,8	2,5
6	554,8	2,5
7	487	2,5
8	317,3	2,5
9	1021,4	1
10	1005	1
11	1193,6	1
12	1101,6	1
13	788	1
14	538,6	1
15	343,9	1
16	289,1	1
17	209,4	1
18	201,8	1

*Supplement til kapittel 3.3.1 og 4.3.1. Triplett FST av hele og delte depottabletter*

*Test H1, H2, D1 og D2: Tablettcelle*

**Tabell 9:** Viser regresjonsligningen fra kalibrering av HPLC, som ble brukt til å beregne konsentrasjon i prøvene fra forsøk med triplett FST for hele og delte depottabletter.

Frisettingstest	Kalibrering
Test H1: triplett m/ hele depot-tabletter	$y = 190,68x - 110,02$ $R^2 = 0,9989$
Test H2: triplett m/hele depot-tabletter	$y = 173,55x - 18,626$ $R^2 = 0,9999$
Test D1: triplett m/ delte depot-tabletter	$y = 190,68x - 110,02$ $R^2 = 0,9989$
Test D2: triplett m/delte depot-tabletter	$y = 173,55x - 18,626$ $R^2 = 0,9999$

*Supplement til kapittel 3.3.1 og 4.3.2. Triplett FST av hele og delte depottabletter*

*Test K1: Originalt oppsett av granulater -og pulvercelle*

**Tabell 10:** Registrert vekt til hver av de tre stykk Theo-Dur® 300 mg depot-tabletter før knusing i morter. Videre registrert vekt av pulverblanding overført til hver gjennomstrømningscelle.

		FTC 1	FTC 2	FTC 3
Vekt	Theo-Dur®, hel	641,2	640,5	629,1
[mg]	Pulverblanding overført	548,9	566,9	552,5

**Tabell 11:** Viser regresjonsligningen fra kalibrering av HPLC, som ble brukt til å beregne konsentrasjon i prøvene fra test K1 som lå innenfor kalibreringskurvens konsentrasjonsområde.

Frisettingstest	Kalibrering
Test K1, triplett m/ knuste depot-tabletter (i originalt granulater -og pulvercelle).	$y = 185,82x - 25,057$ $R^2 = 0,9996$



*Test K2 og K3: Revidert oppsett av granulat -og pulvercelle*

**Tabell 12:** Registrert vekt til hver av de tre stykk Theo-Dur® 300 mg depot-tabletter før knusing i morter. Videre registrert vekt av pulverblanding overført til hver gjennomstrømningscelle.

			FTC 1	FTC 2	FTC 3
Vekt	Test K2	Theo-Dur®, hel	656,6	633	642
		Pulverblanding overført	552	573,7	586,2
[mg]	Test K3	Theo-Dur®, hel	626,3	627,2	623,9
		Pulverblanding overført	563,6	564,8	569,2

**Tabell 13:** Viser regresjonsligningen fra kalibrering av HPLC, som ble brukt til å beregne konsentrasjon i prøvene fra test K2 og test K3.

Frisettingstest	Kalibrering
Test K2, triplett m/ knuste depot-tabletter (i revidert granulat -og pulvercelle).	$y = 185,82x - 25,057$ $R^2 = 0,9996$
Test K3, triplett m/ knuste depot-tabletter (i revidert granulat -og pulvercelle).	$y = 173,55x - 18,626$ $R^2 = 0,9999$

## Appendiks 6

### *Kalibreringstest av pumpe og fraksjonssamler for apparat 4*

Hensikten med denne testen var å undersøke nøyaktigheten til oppløsningsmedias gjennomstrømningshastighet og fyllingsnøyaktigheten av prøvene. Dette ble utført gjennom skriftlig dialog med produsenten av apparat 4 (Erweka) og Standard Operasjonelle Prosedyrer (SOP) tilsendt fra Erweka (24). I henhold til produktspesifikasjonene er maksimalt tillatt avvik for prøvevolum fra nominal verdi er  $\leq 5\%$  ( $\pm 1,25$  mL når innstilling for prøvevolum i programvare/Disso.NET er 25 mL) ved kalibrering av HKP-pumpe med nominal gjennomstrømningshastighet  $\pm 5\%$  (SOP: Flow rate of the USP4 pump). For FRL er maksimalt tillatt avvik for prøvevolum  $\leq 10\%$  ( $\pm 2,5$  mL når innstilling for prøvevolum i programvare/Disso.NET er 25 mL) (SOP: Filling accuracy of sample collector) (24). Målet med kalibreringen (program for adjustment og kalibrering) var også å få mindre variasjoner i prøvevolumene fra FST enn det som var observert i FST gjennom prosjektet. Kopi av dataene fra kalibreringstestene (sjekk-rapportene i Disso.Net) ble oversendt til Erweka for evaluering av den tekniske tilstanden til apparat 4-systemet.

### **Metodebeskrivelse**

HKP-Pumpe og FRL ble kalibrert etter standard operasjonelle prosedyrer (SOP) for apparat 4 etter anvisning fra produsenten (24). Testene ble utført med tre FTC tilkoblet forsyning av oppløsningsmedia. Det ble gjennomført «test-runs», «program for adjustment» og program for kalibrering av HKP-pumpen og FRL for gjennomstrømningshastigheter på 4 ml/min, 8 ml/min og 16 ml/min. Resultatene presenteres kun for gjennomstrømningshastighetene på 4 ml/min og 8 ml/min. Prøvevolumet ble innstilt til 25 mL (20 mL var ikke en valgmulighet i rullegardinmenyen i Disso.Net). Glassbeholderne for prøvene som ble brukt i disse testene var på forhånd veid. Hver prøvebeholder ble merket som knyttet prøvebeholderen til sin registrerte vekt.

Temperaturen i hver av prøvene ble målt (glasstermometer). Prøvevolumet ble så beregnet fra vekt og tetthet til vann (se ligning 1 og ligning 2). Verdier for massetetthet (g/mL) til vann ved de ulike temperaturene er hentet fra tabell (25).

$$\text{Vekt (g)} = \text{Vekt prøvebeholder med vann (g)} - \text{Vekt prøvebeholder tom (g)}$$

## Ligning 1

$$\text{Volum [mL]} = \frac{\text{Vekt (g)}}{\text{Tetthet vann (g/mL)}}$$

## Ligning 2

### Resultater:

Ingen avvik i prøvevolum  $\geq 5\%$  (SOP: Flow rate of the USP4 pump, s 17) ble registrert ved kalibrering av HKP-pumpe for gjennomstrømningshastighetene 4 ml/min og 8 ml/min.

Kalibrering av FRL viste at prøvene hadde større avvik i prøvevolum enn grenseverdien på avvik  $\leq 10\%$  (SOP: Filling accuracy of sample collector, s. 28). Største avvik i prøvevolum var 16 % (+ 3,9 mL, fra FTC 3) når gjennomstrømningshastigheten var 4 ml/min og 23 % (+5,7 mL, FTC 2) når gjennomstrømningshastigheten var 8 mL/min.

Undersøkelse av variasjoner i prøvevolum i apparat 4

For å undersøke om det var mindre variasjoner i prøvevolumene etter kalibreringen, ble det utført en «simulert FST» i apparat 4 uten depottabletter.

### Metodebeskrivelse

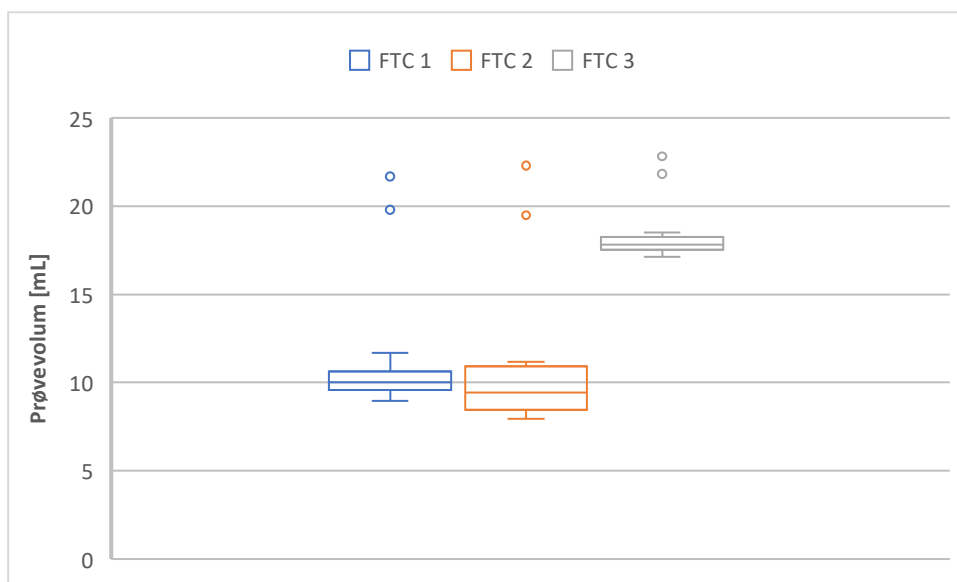
Dette ble gjennomført med tre tablettceller (FTC 1, FTC 2 og FTC 3) tilkoblet oppløsningsmedia. Tablettcellene var oppsatt som beskrevet i kapittel 2.2.1, med prosessparameterne fra tabell 2, kapittel 2.2. Prøvebeholderne for fraksjonssamling var veid på forhånd. Alle 54 prøvebeholderne var merket slik at den enkelte prøvebeholder var knyttet til vekten som var registrert. Prøvevolumet ble beregnet slik som beskrevet i forrige kapittel, metodebeskrivelse for *Kalibreringstest av pumpe og fraksjonssamler for apparat 4*.

Fraksjonen av oppløsningsmedia fra FTC 1, FTC 2 og FTC 3 som ikke gikk til prøvebeholderne, ble samlet i egen avfallsbeholder. Etter endt test, og etter at forsyningslinjene fra FTC var tømt, ble også fraksjonen oppløsningsmedia som ikke gikk til prøvebeholderne, beregnet på tilsvarende måte som prøvene men på vekt PHAUS Explorer EX623. Hensikten var å se om det var stor forskjell mellom totalt forbruk av

opløsningsmedia fra FTC 1, FTC 2 og FTC 3 som ble målt og et teoretisk forventet totalt forbruk, som ble beregnet fra gjennomstrømningshastighet og tid.

## Resultater

Variasjon i prøvevolum fra «simulert FST» er vist som boks-plot (se figur x). Samtlige av ekstremverdiene er prøvene fra testens første to tidsintervaller. Figuren viser at variasjonen i prøvevolum er minst hos FTC 3, og at prøvevolumet for de fleste av prøvene er nærmere verdien for innstilt prøvevolum (20 mL) i Disso.Net enn for FTC 1 og FTC 2.



**Figur 9:** Boks-plot som viser variasjonene i prøvevolum fra tre gjennomstrømningsceller (FTC) 18 prøver fra hver FTC. Forsøket var «simulert FST» i apparat 4.

Tabell x viser fraksjonssamlerens (FRL) fordeling av oppløsningsmedia til prøver og avfall. Det som utmerker seg fra tabellen er at avviket mellom summert volum oppløsningsmedia (avfallsbeholder + prøver) er lite.

**Tabell 14:** Oversikt over målt prøvevolum og forventet prøvevolum beregnet fra oppløsningsmedias gjennomstrømningshastighet (ml/min) og tid (min). Avvik fra prøvevolum som ble målt fra forventet volum (innstilt prøvevolum) er angitt i prosent. Innstilling for prøvevolum i Disso.Net var 20 mL og forsøket var en «simulert FST» i apparat 4.

Kategori	Volum målt i forsøk [ml]	Forventet volum [ml] beregnet fra [ml/min] x [min]	Avvik [prosent]
FTC 1	201,9	360	-43,9
FTC 2	190,6	360	-47,1
FTC 3	329,1	360	-8,58
Avfallsbeholder	4216	3720	13,3
<b>Summert:</b>	<b>4928</b>	<b>4800</b>	<b>2,67</b>
Avfallsbeholder + prøver <sup>(a)</sup>			

\*Prøver er her fellesbetegnelsen for oppsamlet oppløsningsmedia fra fraksjonssamleren, 18 prøver for hver av FTC 1, FTC 2 og FTC 3.

### Diskusjon/konklusjon

Fra tabell 14 ses en stor variasjon i oppsamling av prøvevolum. På grunn av at avfall ikke ble målt for FTC 1, FTC 2 og FTC 3 hver for seg, er det ikke mulig å si hvorvidt dette bare skyldes feil i automatisk prøveoppsamling fra fraksjonssamleren eller om gjennomstrømningshastigheten også påvirkes. Dette er uansett problematisk med tanke på at prøveoppsamlingen for hver av de tre FTC ikke skjer under like betingelser.

## Appendiks 7 Evaluering av noen prosessparametere til preliminær metode

### *Variasjon i prøver av teofyllin med konsentrasjon tilsvarende kvantifiseringsgrensen*

#### Metodebeskrivelse

Kvantifiseringsgrensen (engelsk; limit of quantification, forkortet LOQ) ble beregnet (26). Deretter ble det laget en løsning av teofyllin anhydrat med samme konsentrasjon som beregnet LOQ, [0,021 mg/L] (som beskrevet i kapittel 2.1.4, men uten filtering). Fra denne

løsningen ble det tatt ut tre prøver som ble analysert i HPLC med gradient eluering, 2 målereplikater av hver prøve.

## Resultater

**Tabell 15:** Viser variasjonen i areal, høyde og retensjonstid for teofyllin fra HPLC-analyse av teofyllinløsning med konsentrasjon ved kvantifiseringsgrense [0,021 mg/L]. Variasjonen er beregnet fra 6 bestemmelser (3 alikvoter fra teofyllinløsning x 2 målereplikater av hver, n=6).

	<b>Areal [mAU*s]</b>	<b>Høyde [mAU]</b>	<b>Retensjonstid [min]</b>
<b>Gjennomsnitt (<math>\pm</math> SD)</b>	4,749 ( $\pm$ 0,293)	0,794 ( $\pm$ 0,053)	7,240 ( $\pm$ 0,007)
<b>Relativt standardavvik</b>	6,161 %	6,712 %	0,094 %

