

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



DISEÑO DE UNA PRUEBA DE PERFIL DE DISOLUCIÓN PARA TABLETAS DE AMLODIPINO DE 5 mg.

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:**

RODOLFO OSCAR ALFARO HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F. 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: HENDEL analytical SERVICES S. DE R.L. DE C.V.

DIRECTOR DE TESIS: _____
M. EN C. ALMA ELENA IBARRA CAZARES

ASESOR DE TESIS: _____
Q.F.B. CATALINA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

SUSTENTANTE: _____
RODOLFO OSCAR ALFARO HERNÁNDEZ

JURADO ASIGNADO

| | |
|-------------------------------------|------------|
| DRA. LETICIA CRUZ ANTONIO | PRESIDENTE |
| Q.F.B. CATALINA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ | VOCAL |
| M en C. ALMA E. IBARRA CAZARES | SECRETARIO |
| Q.F.B. IRMA ALEJANDRE RAZO | SUPLENTE |
| MTRA. MA. ISABEL GARDUÑO POZADAS | SUPLENTE |

Índice.

| | |
|---|----|
| 1. Introducción..... | 1 |
| 2. Fundamentación Teórica..... | 2 |
| 2.1 .Aspectos generales de disolución..... | 2 |
| 2.2 .Teorías de Disolución..... | 2 |
| 2.3 .Cinética de disolución..... | 4 |
| 2.4 .Prueba de perfil de disolución..... | 5 |
| 2.5 .Factores que determinan un proceso de disolución aparente..... | 6 |
| 2.5.1 Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del Fármaco..... | 6 |
| 2.5.2 Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del medicamento..... | 6 |
| 2.5.3 Factores relacionados con el proceso de fabricación..... | 6 |
| 2.5.4 Factores relacionados con las condiciones del sistema de disolución..... | 7 |
| 2.6 .Aparatos de disolución..... | 8 |
| 2.6.1 Aspectos generales del aparato de disolución 2(Paletas)..... | 10 |
| 2.6.2 Calificación del aparato de disolución..... | 11 |
| 2.7 .Desarrollo de una prueba de disolución..... | 13 |
| 2.8 .Evaluación de perfiles de disolución..... | 13 |
| 2.9 Aplicaciones del perfil de disolución..... | 14 |
| 2.10 Validación del método analítico..... | 15 |
| 2.11 Monografía de Amlodipino..... | 18 |
| 2.11.1 Historia de los Bloqueadores de canales de Ca ⁺ | 18 |
| 2.11.2 Estructura química..... | 18 |
| 2.11.3 Propiedades fisicoquímicas..... | 19 |
| 2.11.4 Indicciones terapéuticas..... | 19 |
| 2.11.5 Propiedades farmacológicas..... | 19 |
| 3. Planteamiento del problema..... | 21 |
| 4. Objetivos..... | 21 |
| 5. Hipótesis..... | 21 |
| 6. Material y metodología..... | 22 |
| 6.1. Equipo..... | 22 |
| 6.2. Material..... | 22 |
| 6.3. Reactivos..... | 22 |
| 6.4. Metodología..... | 23 |
| 6.5. Preparación de soluciones y medios..... | 24 |
| 6.6. Evaluación inicial de los productos farmacéuticos de estudio..... | 25 |
| 6.7. Perfiles de disolución..... | 26 |
| 6.8. Validación del método analítico para la cuantificación de Amlodipino en un perfil de disolución..... | 28 |
| 7. Resultados y discusión de resultados..... | 30 |
| 8. Conclusiones..... | 48 |
| 9. Propuestas y/o recomendaciones..... | 49 |
| 10. Anexos..... | 50 |
| 11. Bibliografía..... | 51 |

1. Introducción

El perfil de disolución es la caracterización de la liberación del o los principios activos de una forma farmacéutica, en condiciones in vitro, mediante esta prueba se busca hacer una comparación entre un medicamento de prueba y un medicamento de referencia (de patente) mediante, esta comparación se hace mediante herramientas matemáticas como son el factor de similitud y el factor de diferencia.

La comparación mediante el perfil de disolución de los dos medicamentos nos da una aproximación de lo que será el comportamiento en cuanto a disolución por parte del principio activo, dentro del organismo, este fenómeno de disolución es de suma importancia ya que esta directamente ligado con la acción terapéutica que tendrá el medicamento en el paciente.

Dentro del diseño de una prueba de perfil de disolución se deben tomar en cuenta varios parámetros como son: la elección del medio de disolución, la velocidad de agitación, los tiempos de muestreo, el aparato que será usado, así como todas las propiedades fisicoquímicas del principio activo contenido en el medicamento de interés. La evaluación de estos parámetros se realizó mediante el cálculo de la eficiencia de disolución y los porcentajes disueltos en cada uno de los tiempos en cada una de las condiciones propuestas, las cuales son: velocidades de agitación de 50 y 75 rpm, medios de disolución con un pH ácido hasta un pH de 6.8 y tiempos de muestreo que van de los 5 minutos hasta los 60 minutos. Una vez evaluados estos parámetros y después de haber seleccionado las condiciones óptimas para llevar a cabo el perfil de disolución se lleva a cabo la validación del método analítico con el cual se cuantifica la cantidad de principio activo disuelto en el medio de disolución. Dentro de los parámetros que se evaluaron dentro de la validación del método en este trabajo están la linealidad del sistema y del método, la precisión, la exactitud, la interferencia de los filtros empleados en la prueba de disolución, la estabilidad de las soluciones entre otros.

Todos los puntos anteriores son parte de los requisitos plasmados en la NOM 177, norma que rige todo lo relacionado a las pruebas de intercambiabilidad para medicamentos Genéricos Intercambiables, de aquí la importancia de los perfiles de disolución y su diseño, ya que esta prueba es parte de la primera etapa de las pruebas de intercambiabilidad, las cuales constan desde las buenas prácticas de fabricación bajo las que se produce el medicamento, los perfiles de disolución con los cuales se obtiene el comportamiento in vitro del medicamento hasta llegar a pruebas de bioequivalencia, todo esto para demostrar que un medicamento Genérico Intercambiable (GI) tiene la misma eficacia y seguridad que la brindada por un medicamento de patente.

Los medicamentos que son susceptibles a ser Genéricos son publicados en un listado oficial de la Secretaría de Salud, dentro de esta lista se encuentran las tabletas de Amlodipino, medicamento que ha perdido su patente por lo cual surge la necesidad del diseño de un perfil de disolución para este medicamento.

2. Fundamentación Teórica.

2.1 Aspectos generales de la disolución de fármacos.

La disolución es el proceso mediante el cual una sustancia se dispersa en otra, a nivel molecular, determinado por la afinidad entre ambas especies moleculares. En el caso de una disolución sólido líquido, el soluto pasa al disolvente para dar origen a una solución homogénea, involucrando transferencia de masa a través de un proceso de difusión. La cuantificación de los cambios de concentración del soluto en la solución respecto al tiempo, representan un proceso cinético denominado velocidad de disolución. Existen dos tipos de disolución, uno de ellos es, la disolución intrínseca, la cual hace referencia a las características de disolución del fármaco puro, en condiciones de superficie constante; y la disolución aparente, en la cual se evalúa el proceso de disolución de un fármaco contenido en una forma farmacéutica sin considerar una superficie constante del sólido, es decir; se determina la cantidad de sólido disuelto por unidad de tiempo. ⁽¹⁾

2.2 Teorías de disolución.

La primera teoría sobre disolución es la del modelo de difusión de Fick del año 1855 en la que se plantean dos pasos en el proceso de disolución, en el primer paso se forma una solución saturada del mismo y en el segundo paso se lleva a cabo una transferencia de masa en la interface hacia el seno del líquido, siendo el segundo paso el proceso más lento ya que se efectúa exclusivamente por difusión. ^(1,2) Ver Figura 1

Por tanto la velocidad de disolución del sólido está determinada por el movimiento Browniano de difusión de las moléculas disueltas en la capa estacionaria.

La segunda etapa se representa mediante la siguiente ecuación.

$$\frac{dW}{dT} = -DA \frac{dC}{dx}$$

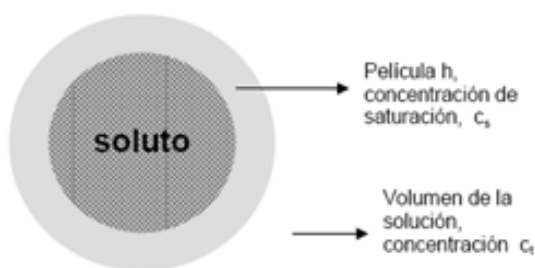


Figura 1 Teoría de la capa estacionaria

En donde:

D= coeficiente de difusión (cantidad de soluto que atraviesa 1 cm² de superficie en unidad de tiempo.

dW/dT= es la cantidad de soluto que difunde a través de un área A en un tiempo dT, cuando la concentración cambia de una cantidad dC a través de una distancia dX en un ángulo recto al plano de A.

dC/dT= velocidad de disolución del soluto.

En 1897, Noyes y Whitney estudiaron la disolución del ácido benzoico y cloruro de plomo en agua, propusieron una ecuación para explicar sus resultados, en esta ecuación se sugiere que la velocidad de disolución de las sustancias sólidas está determinada por la velocidad de difusión de una capa muy delgada de solución saturada que se forma instantáneamente alrededor de la partículas. La ecuación que describe el modelo postulado por Noyes-Whitney es la siguiente: ^(1,2)

$$\frac{dc}{dt} = K (Cs-Ct)$$

En donde:

$\frac{dc}{dt}$ = Velocidad de disolución.

K= Constante de disolución

Cs= Concentración de saturación

Ct= Concentración a un tiempo determinado.

La teoría de la capa estacionaria.

En 1904 Nerst enunció la teoría de la película de difusión, en donde propone que existe una delgada capa líquida de longitud alrededor de la partícula, en la cual la velocidad en dirección x (perpendicular a la superficie del sólido) es insignificante; a distancias mayores de h, existe un rápido movimiento del solvente y debido a eso, no existe un gradiente de concentración en esta región, por lo tanto la velocidad de disolución está determinada por un movimiento de difusión de las moléculas en la capa líquida. ^(1,2)

Bruner incorporó a su modelo la primera ley de difusión de Fick y la ecuación de Noyes y Whitney con la inclusión del área (S), e introdujo el coeficiente de difusión D, la delgada película de difusión h y el volumen del medio de disolución v. ^(1,2)

$$Dc/dt = k_1 S (Cs-Ct)$$

Teoría de la renovación superficial, está fue propuesta por Dankwerts en 1951 y establece que:

- No existe una capa estacionaria de saturación alrededor de las partículas sólidas.
 - El flujo del disolvente alrededor de las partículas es del tipo turbulento.
 - El líquido sobre la superficie del sólido es constantemente reemplazado por disolvente "fresco" o "limpio".
- El modelo propuesto por Dankwerts puede ser descrito como una capa muy delgada alrededor de la partícula sólida. ^(1,2)

2.3 Cinéticas de disolución.

Disolución de orden cero

Este orden de disolución se puede observar en los casos en los que se disuelve una pequeña cantidad de producto sólido en un gran volumen de disolvente. En un sistema así, la cantidad de sólido es pequeña en relación al volumen total del líquido de disolución, y se describe con el siguiente esquema ^(1,2):



Donde:

A: cantidad de fármaco agregado inicialmente al medio de disolución

Q: cantidad de fármaco en solución

K_0 : constante de velocidad de orden cero.

En este modelo, la velocidad con la que el sólido se disuelve es constante con el tiempo e independiente de la concentración del soluto

Disolución de primer orden

En los procesos que siguen la cinética de disolución de primer orden, a medida que el fármaco en estado sólido va disminuyendo, la solución se va enriqueciendo con el soluto, por lo que la velocidad de disolución se encuentra en función de la concentración del fármaco disuelto. La ecuación que describe la cinética de disolución de primer orden es: ^(1,2)

$$A = A_0 e^{-K_1 t}$$

Donde A es la cantidad de fármaco no disuelto al tiempo, A_0 es la cantidad de fármaco agregado inicialmente y K_1 es la constante de velocidad de disolución.

Para obtener los parámetros de disolución de primer orden, se lineariza la ecuación obteniéndose:

$$\ln A = \ln A_0 - K_1 t$$

Así, al graficar la cantidad remanente por disolver ($\ln A$) contra el tiempo, se obtienen una recta cuya pendiente es igual a $-K_1$; es decir, la constante de velocidad de primer orden presenta dimensiones de 1/tiempo, y el tiempo de vida media se obtiene a partir de la ecuación ^(1,2):

$$t_{1/2} = (\ln 2)/K_1$$

Modelo de la raíz cubica.

En 1931, Hixon y Crowell llevaron a cabo extensos estudios sobre la teoría de disolución de sólidos y dedujeron la expresión conocida como la ley de la raíz cúbica, en la cual la velocidad de disolución de un sólido en un líquido se expresa en función del área superficial y de la concentración ^(1,2).

Los supuestos en los que se basa la ley de la raíz cubica son ^(1,2):

- El proceso de disolución se lleva a cabo en forma normal, con respecto a la superficie del sólido y el efecto de la agitación contra cualquier parte de la superficie es el mismo.
- Las diferencias en la velocidad de disolución en las diferentes caras de la partícula son insignificantes puesto que todas las caras participan para proporcionar una velocidad promedio.
- La agitación en los alrededores de la partícula es tan intensa que el líquido no se estanca en esa región. La ley no es aplicable cuando no hay agitación.

Partiendo de la ecuación de Noyes- Whitney llegaron a la ecuación de la raíz cúbica

$$(W_0)^{1/3} - (W)^{1/3} = K_{1/3} t$$

Donde:

W_0 = representa el peso inicial de las partículas,

W = peso de las partículas a un tiempo

t = tiempo

$K_{1/3}$ = Constante de velocidad de disolución.

Al graficar $(W_0)-(W)^{1/3}$ respecto al tiempo, se obtiene la constante de la raíz cúbica a partir de la pendiente, en sus respectivas unidades: $(\text{masa})^{1/3}/\text{tiempo}$ ^(1,2)

2.4 Prueba de Perfil de disolución.

El perfil de disolución es la determinación experimental de la cantidad de fármaco disuelto a diferentes tiempos, en condiciones experimentales controladas, a partir de una forma farmacéutica. ^(3,4)

Mediante la determinación de un perfil de disolución se puede representar la velocidad de disolución gráficamente.

Un perfil está compuesto por diferentes etapas que son ⁽²⁾:

- Tiempo de retardo, humectación del sólido.
- Desintegración y disgregación del sólido.
- Aumento del área entre el sólido y el líquido disponible.
- Final del proceso.

El procedimiento de disolución requiere de un aparato, un método de disolución y condiciones de prueba que provean un método discriminatorio lo suficientemente resistente y reproducible para las operaciones diarias y capaz de ser transferido entre laboratorios. ^(4,5)

El procedimiento debe ser adecuadamente discriminatorio, con capacidad para distinguir cambios significativos en la composición o en el proceso de fabricación que puede esperarse afecten el desempeño in vivo. Es posible que también que el procedimiento muestre diferencias entre lotes y que no existan diferencias significativas cuando se observa in vivo. Esta situación requiere evaluar cuidadosamente si el procedimiento es demasiado sensible o adecuadamente discriminatorio. ⁽⁵⁾

Una prueba de perfil de disolución diseñada adecuadamente debe dar como resultados que no sean demasiado variables así como no deben estar asociados a problemas de estabilidad significativos de la solución analítica. La una gran desviación estándar relativa de los resultados puede dificultar la identificación de tendencias o efectos referentes a los cambios de formulación. Los resultados de disolución pueden considerarse demasiado variables si la desviación estándar relativa (RSD) es más de 20% a los 10 minutos o menos y más de 10% RSD a tiempos mayores. Sin embargo, la mayor parte de los resultados presentan menor variabilidad y se debe tratar de reducir si fuera factible. ^(4, 6, 7)

Las dos causas de variabilidad más importantes se vinculan con la formulación en sí (por ejemplo: fármacos, excipientes o proceso de fabricación) o con aspectos asociados al procedimiento de prueba (por ejemplo: formación de conos, tabletas que se adhieren a la pared del vaso o la malla de la canastilla.) ^(2, 6)

2.5 Factores que determinan un proceso de disolución aparente.

Cuando el fármaco está contenido en una forma farmacéutica, la disolución se inicia cuando esta se encuentra en el medio de disolución, pasando primero por el proceso de desintegración, con el subsecuente rompimiento de la unidad para formar gránulos, que después se desintegran para formar partículas finas. La disolución termina cuando el principio activo se encuentra en solución. Todo este proceso se ve afectado por diferentes factores que son:

2.5.1 Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del fármaco.^(2,6,8)

Las propiedades fisicoquímicas del fármaco desempeñan un papel primario en el control de su disolución a partir de un medicamento, como es:

- Estado amorfo o cristalino. Las formas de un fármaco usualmente presentan mayor solubilidad y por lo tanto mejor grado de disolución en comparación con la que presenta una forma cristalina.
- Grado de hidratación. El grado de hidratación es un factor importante ya que se ha encontrado que las formas anhidras tienen una solubilidad y disolución acuosa mayor que las hidratadas
- Estado químico (ácido, base o sal). La formación de sales tienen por objetivo tener una forma ionizada del fármaco, para aumentar su disolución, el pKa del compuesto también influye significativamente.

Tamaño de partícula. Dado que el área de superficie aumenta con la disminución del tamaño de partícula, puede lograrse velocidades de disolución mayores, por ejemplo cada vez siendo más utilizada la micronización.^(2,6,8)

2.5.2 Factores relacionados a las propiedades fisicoquímicas del medicamento: formulación, proceso de fabricación y caducidad.^(2,6,8)

Factores relacionados con la formulación.

Se ha demostrado que la velocidad de disolución de un fármaco puro puede verse alterada de forma significativa cuando se mezcla con diversos aditivos durante el proceso de elaboración de los preparados sólidos:

- Diluentes y desintegrantes. Uno de los diluentes más utilizados es el almidón, el cual puede aumentar la velocidad de disolución en fármacos hidrófobos al formar una capa fina de partículas de almidón impartiendo una propiedad hidrófila al medicamento y por ende la velocidad de disolución.
- Aglutinantes y agentes de granulación. Pueden darle características hidrófilas a la superficie hidrofóbica de un fármaco, mejorando su solubilidad.
- Lubricantes. Los lubricantes hidrófobos como el estearato de magnesio, estearato de aluminio, ácido esteárico y el talco reducen el área de interface del fármaco con el disolvente por la modificación de las características de la superficie del comprimido, dando una disminución en la capacidad de humidificación, la prolongación de su tiempo de desintegración y disminución de su disolución.^(2,6,8)

2.5.3 Factores relacionados con el proceso de fabricación.

El proceso de granulación aumenta en general la velocidad de disolución de los fármacos poco solubles. El proceso de granulación húmeda ha sido considerado tradicionalmente como un método superior al procedimiento de doble compresión o de compresión en seco. En general la granulación húmeda mejora la velocidad de disolución ya que proporciona propiedades hidrófilas a la superficie de los granulados.

Sin embargo con los nuevos equipos y materiales para la elaboración de comprimidos, resulta más evidente que una cuidadosa preparación, una apropiada secuencia de mezclado y el tiempo en el que se agregan los diversos ingredientes son los criterios principales que afectan las características de disolución.

También se ha encontrado que la fuerza de compresión tienen un gran efecto sobre la disolución, ya que de esta depende la densidad aparente, la porosidad, la dureza y el tiempo de desintegración; el efecto inhibitor es debido al aumento de la unión entre las partículas produciendo un aumento en la densidad y la dureza y por lo tanto la reducción de la penetrabilidad del disolvente.^(2,6,8,9)

2.5.4 Factores relacionados con las condiciones del sistema de disolución: aparato de disolución, tipo de muestreo, velocidad de agitación, medio de disolución. Estos son los factores con los que se diseñara la prueba de disolución y estos se ajustaran de acuerdo al principio activo y de acuerdo a la forma farmacéutica que se tenga. Según la NOM 177 SSA y la Guidance for Industry “Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms”.^(4, 6, 7)

Medio de disolución: las propiedades fisicoquímicas del fármaco, así como la forma de dosificación deben determinarse antes de seleccionar el medio de disolución ya que de estos depende el sitio de absorción del principio activo y en base a esto se debe de simular lo más que se pueda las condiciones de pH a las que se encuentra el medicamento durante su proceso de disolución en el organismo. Dos propiedades claves del producto farmacéutico son la solubilidad y la estabilidad del fármaco en solución en función del valor del pH. Cuando se selecciona la composición del medio, se debe evaluar la influencia de las soluciones amortiguadoras, el valor del pH y los surfactantes respecto a la solubilidad y la estabilidad del fármaco. Las propiedades claves de la unidad de dosificación que pueden afectar la disolución incluyen el mecanismo de liberación (inmediato, retardado o modificado) y la velocidad de desintegración afectados por la dureza, la friabilidad, la presencia de potenciadores de solubilidad y otros excipientes.^(5, 8)

Cuando se desarrolla un procedimiento de disolución, una meta es tener condiciones de exceso de medio (sink conditions), definido como el volumen de medio igual a por lo menos tres veces volumen requerido para formar una solución saturada del fármaco. Cuando la condición de exceso de medio está presente, existirán mayores probabilidades de que los resultados de disolución reflejen las propiedades de la forma farmacéutica. Un medio que no cumple con la condición de exceso de medio puede ser aceptable si el medio demuestra ser más discriminatorio o de otro modo se justifica adecuadamente.⁽⁵⁾

No se recomienda emplear una mezcla de un disolvente orgánico y agua como medio de disolución; sin embargo, puede ser aceptable si existe una justificación apropiada para este tipo de medio.⁽⁵⁾

El uso de agua como medio de disolución no es lo ideal debido a diferentes razones entre las cuales esta:⁽⁵⁾

- La calidad del agua la cual depende de la fuente.
- El valor de pH puede variar día a día y también puede cambiar durante la corrida, dependiendo de la sustancia activa y los excipientes.

Aunque el agua tiene otras ventajas como son: su fácil eliminación, que es económica, ecológicamente aceptable y apta para productos con una velocidad de liberación independiente del valor de pH del medio.

Las características de disolución de una formulación oral deben evaluarse en el rango de pH fisiológico entre 1,2 y 6,8.

Aditivos al medio de disolución: Los medios típicos para disolución pueden incluir los siguientes elementos: ácido clorhídrico diluido, soluciones amortiguadoras, alcohol, fluido intestinal o gástrico simulados (con o sin enzimas), agua y surfactantes (con o sin ácidos o soluciones amortiguadoras) tales como Polisorbato 80, Polisorbato 20, Lauril Sulfato de Sodio, Dodecil Sulfato de Sodio, Bromuro de Cetiltrimetilamonio sales biliares etc^(5, 10, 11, 12, 13). Los porcentajes en los que se emplean comúnmente aditivos en el medio de disolución son bajos como se puede observar en la Tabla 1

| Aditivo | % de uso |
|---------------------------------|------------|
| Polisorbato 80 | 0.10-1% |
| Polisorbato 20 | 0.0-0.70 % |
| Alcohol | 0.0-17.0% |
| Lauril Sulfato de Sodio. | 0.0-3% |
| Dodecil Sulfato de Sodio | 0.0-2.2% |
| Bromuro de Cetiltrimetilamonio. | 0.0-1% |

Tabla 1. Aditivos usados en medios de disolución

En especial el uso de la clase de surfactante dependerá de la naturaleza acida, básica o neutra de la molécula del principio activo, se recomienda el uso de surfactantes cationicos para principios activos ácidos, surfactantes anionicos para principios activos básicos y surfactantes no iónicos para análisis de cualquier tipo.⁽¹¹⁾

Volumen del medio de disolución: para aparatos con canastilla o paletas, el volumen del medio de disolución normalmente se encuentra entre 500 y 1000 mL, siendo 900 mL. el volumen más común.⁽⁵⁾

Agitación. Para capsulas o tabletas de liberación inmediata, los aparatos de mayor uso son el aparato 1 (canastillas) a 100 rpm o el aparato 2 (paletas) a 50 ó 75 rpm. Las velocidades menores de 25 o mayores de 150 rpm son usualmente inapropiadas debido a la inconsistencia de la hidrodinámica por debajo de 25 rpm y por la turbulencia por encima de 150 rpm. Las velocidades de agitación entre 25 y 50 rpm son generalmente aceptables para las suspensiones. Para formas de dosificación que presentan la formación de conos (montículos) debajo de la paleta a 50 rpm, el cono puede reducirse al aumentar la velocidad de la paleta a 75 rpm, reduciendo el artefacto y, de este modo, mejorar los datos. El aumentar o disminuir la velocidad de rotación del aparato puede justificarse si los perfiles reflejan mejor el desempeño in vivo y/o los resultados del método demuestran una mejor discriminación sin afectar la reproducibilidad del métodos.^(5, 7)

Tipo de muestreo. El muestreo se debe efectuar siempre en el mismo sitio y con la menor turbulencia posible, con la finalidad de mantener el patrón de flujo constante y reproducible.^(1,5)

Las alícuotas necesarias para el análisis se toman en la zona intermedia entre la superficie del medio de disolución y la parte superior de la canastilla o la paleta y a no menos de 10 mm de la pared del vaso.

El muestreo puede realizarse de dos maneras:

- 1) Manual- en el muestreo manual se emplean jeringas de plástico o de vidrio, una cánula de acero inoxidable que usualmente es curva para permitir el muestreo del vaso, un filtro y/o un soporte para el filtro.
- 2) Automático- el muestreo automático es una alternativa útil al muestreo manual, especialmente en los caso del perfil de disolución ya que se llevan a cabo varios muestreos. Los controles rutinarios de desempeño, la limpieza y el mantenimiento descritos en los correspondientes procedimientos operacionales estándares o en la documentación de metrología son de utilidad para el funcionamiento confiable de estos dispositivos.

El filtro empleado en la toma de muestra debe ser inerte, sin causar absorción significativa del ingrediente activo de la solución, no debe contener materiales extraíbles por el medio de disolución y no debe interferir con los procedimientos analíticos prescritos

2.6 Aparatos de disolución

Las pruebas de disolución son realizadas usando un aparato específico, el cual es escogido dependiendo principalmente de la forma de dosificación del medicamento. En la actualidad existen siete tipos de aparatos de disolución: el aparato de canastillas (USP 1), el aparato de propelas (USP 2), el aparato de cilindros oscilantes (USP 3), la celda de flujo continuo (USP 4), aparato de propela sobre disco (USP 5), aparato de cilindro (USP 6) y el aparato de soporte de oscilación vertical (USP 7); en la USP existen únicamente 4 aparatos oficiales que son el USP 1, 2, 3 y 4, mientras que en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos únicamente están registrados los aparatos de canastillas y propelas (USP 1 y 2, respectivamente).^(5, 14, 15, 16, 17)Ver **Error! Reference source not found.**

La elección del aparato se basa en el conocimiento que se tenga sobre el diseño de la formulación y los aspectos prácticos del desempeño de la forma farmacéutica en el sistema de la prueba in vitro. El aparato 1 y el 2 son los aparatos que con mayor frecuencia se utilizan para formas farmacéuticas sólidas

| Disolutor: | USP I (canastillas) | USP II (propelas) |
|--------------|--|---|
| Ventajas. | <p>-La ventaja básica de este método, es que mantiene la forma de dosificación confinada e inmersa totalmente en el medio de disolución, lo cual es esencial para el intercambio entre la fase sólida y líquida. La constancia de este intercambio permite obtener resultados de disolución reproducibles y veraces.</p> | <p>-Un patrón de flujo más estable que el obtenido con las canastillas y por tanto mejor dispersión del sólido para la disolución.</p> <p>-Una buena inspección visual de la forma farmacéutica durante el tiempo de la prueba, para apoyar en su caso, la explicación de algún problema.</p> <p>-El recubrimiento de polifluorocarbono de las propelas, es un material con alto grado de inercia, lo cual previene cualquier interferencia con el método analítico para cuantificar el fármaco disuelto.</p> |
| Desventajas. | <p>-La ocasional obstrucción de los claros del tamiz de la canastilla.</p> <p>-La salida de partículas del interior de la canastilla, causando un cambio en el patrón de flujo del fluido, y el área de intercambio sólido-líquido, ocasionando altos coeficientes de variación en los resultados de disolución.</p> <p>-Eventualmente se forma una cámara de aire en la parte superior de la canastilla provocando diferencia de hasta un 50% del fármaco disuelto.</p> | <p>-El método es muy sensible a las variaciones de patrón de flujo del disolvente.</p> <p>-La presencia de una pequeña variación en la geometría o en la continuidad de la superficie de la propela, provoca patrones de flujo muy distintos a los normales, dando como consecuencia resultados dispersos, no reproducibles o inexactos.</p> <p>-Si la forma farmacéutica no está correctamente centrada se presentarían resultados no reproducibles e inexactos.</p> <p>-Si el producto es menos denso que el medio este tendería a flotar provocando resultados inaceptables.</p> |

Tabla 2 Ventajas y desventajas de los aparatos de disolución USP 1, 2. ^(2, 4)

2.6.1 Aspectos generales del aparato 2 de disolución (paletas.)

El aparato consiste de:

- Vaso: el vaso es cilíndrico y de fondo semiesférico, para un litro de capacidad nominal este debe ser de una altura entre 160 mm y 210 mm y diámetro interno entre 98 mm y 106 mm, además puede ser con o sin tapa y hecho de vidrio u otro material inerte y transparente
- Un motor
- Un elemento de agitación (paleta) compuesto por un aspa y un eje. La paleta debe ser metálica o de otro material inerte. El eje propulsor se debe colocar de forma tal que el extremo inferior del aspa este nivelado con el extremo inferior del propulsor. La paleta de cumplir con las especificaciones que se indican en la Figura 2. La distancia entre el fondo interno del vaso y del aspa se mantiene en $25 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$ durante la prueba.

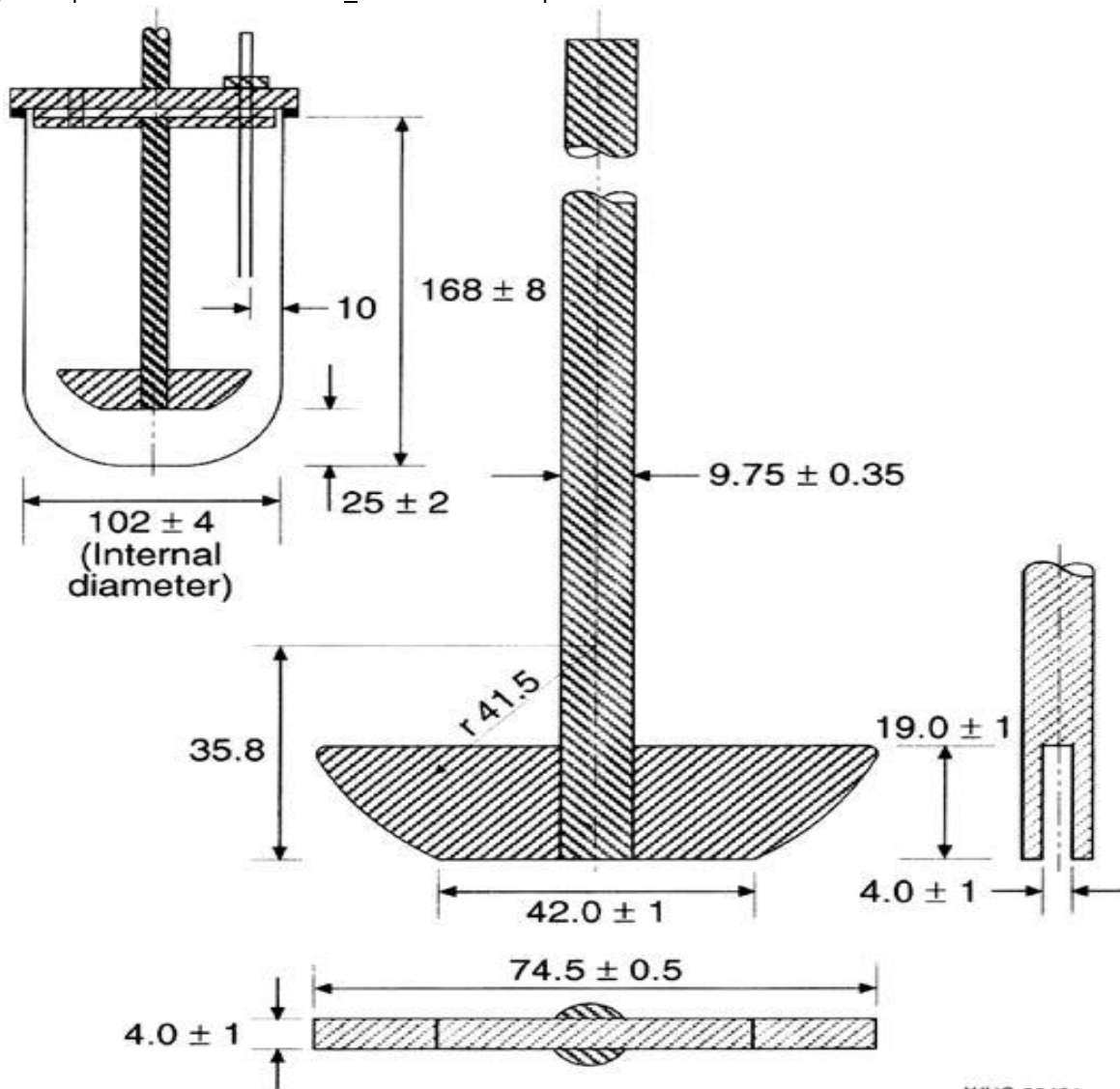


Figura 2 Elemento de agitación (paleta) y vaso.

El vaso está parcialmente sumergido en un baño de agua adecuado de cualquier dimensión conveniente o recibe calor de un dispositivo adecuado, como por ejemplo una camisa de calentamiento. Durante el transcurso de la prueba, el baño de

agua o el dispositivo de calentamiento mantienen la temperatura en el interior del vaso a $37 \pm 0,5$ °C y garantiza que el fluido del baño se mantenga en movimiento suave y constante. Ninguna parte del equipo, ni el entorno en el cual está colocado, aumenta significativamente el movimiento, agitación o vibración, por encima de los producidos por el elemento de agitación que gira con suavidad. Es preferible un aparato que permita observar la muestra y el elemento de agitación durante la prueba.

Aptitud del aparato. La determinación de la aptitud del aparato que se utilizará en la prueba de disolución debe incluir el cumplimiento de las dimensiones y tolerancias indicadas anteriormente. Otros parámetros de prueba cruciales que es necesario controlar periódicamente mientras se usa el aparato, incluyen el volumen y la temperatura del medio de disolución, la velocidad de rotación.

Se debe controlar periódicamente, que el desempeño del equipo de disolución sea aceptable mediante la prueba de aptitud del aparato.

Prueba de aptitud del aparato 2 (paletas)- Analizar individualmente 1 tableta de un calibrador de disolución USP, tipo desintegrable, y por otro lado 1 tableta de calibrador de disolución USP, tipo no desintegrable, de acuerdo con las condiciones operativas especificadas. El aparato es apto si los resultados obtenidos están dentro del intervalo aceptable que aparece en el certificado del calibrador. ^(5, 12, 13, 14)

2.6.2 Calificación del aparato de disolución.

Para tener un alto grado de aseguramiento que el aparato de disolución es constante y exacto en su funcionamiento se requiere de su validación la cual engloba la calificación y calibración del equipo. La validación es definida como las pruebas documentadas que proporcionan un alto grado de aseguramiento de que un aparato/instrumento específico funciona según los datos específicos del fabricante y exigencias de usuario. La validación es alcanzada realizando una serie de actividades dentro de las cuales se involucra la calificación de instalación y la calificación operacional. La calificación operacional se puede clasificar en dos ^(5, 14, 18)

Calificación física: los parámetros que se deben tomar en cuenta para una calificación física son los siguientes ⁽⁵⁾:

- Velocidad de agitación: el regulador de velocidad de rotación, debe mantener la velocidad constante de acuerdo a lo indicado en el método, con una variación de $\pm 4,0$ por ciento. La velocidad se puede registrar mediante un tacómetro óptico.
- Altura: la distancia entre el fondo del vaso y la paleta debe ser de $25 \text{ mm} \pm 2 \text{ mm}$, esta se ajusta mediante el uso de pelotas calibradoras con un diámetro de 25 mm las cuales son colocadas en el fondo del vaso, después se bajan las paletas hasta que hagan contacto con la pelota, y se fijan las paletas a esa altura.
- Bamboleo: el bamboleo desde el centro del eje es de $\pm 1 \text{ mm}$ y es evaluado mediante un medidor de bamboleo calibrado.
- Temperatura: la temperatura en cada uno de los vasos debe ser de $37 \pm 0,5$ °C y esta debe ser monitoreada cada 5 minutos en cada uno de los vasos mediante un termómetro calibrado con una escala de 0,5 °C
- Centrado: el eje de agitación debe estar en el centro del vaso con una variación de $\pm 2 \text{ mm}$. El centrado puede ser realizado mediante una herramienta de verificación de centrado.
- Vibración: La vibración no debe ser mayor que 0.1mils (aproximadamente 0.025mm).La frecuencia o aceleración térmicas es muy apropiado.
- Nivelación: el nivel del instrumento se verifica al centro del frente del instrumento, al fondo, y hacia el lado izquierdo y derecho del soporte de los vasos, mediante un nivel de burbuja, en el cual la burbuja se debe encontrar en el centro del nivel.

Calificación química: la calificación química del disolutor asegura la adecuabilidad del aparato para efectuar pruebas de disolución y perfil de disolución ^(5,9, 12). La manera como se lleva a cabo la calificación química del aparato 2 es la descrita en la Tabla 2 y Tabla 3.

- **Tabletas desintegrantes de Prednisona.** Determinar el porcentaje de prednisona disuelto bajo las siguientes condiciones:

| Aparato | II (paletas) |
|-------------------------------|------------------------------------|
| Medio de disolución | Agua desgasificada. |
| Velocidad de Agitación | 50 rpm |
| Volumen | 500 mL. |
| Temperatura del medio | 37 ± 0.5 ° C |
| Tiempos de muestreo | 30 minutos |
| Tipo de muestreo | Automatizado |
| Volumen de alícuota | 10 mL. |
| Método de análisis | Espectrofotometria UV 242nm |

Tabla 2. Condiciones de disolución para tabletas de prednisona

El porcentaje disuelto de prednisona debe ser entre 37-70 %.

- **Tabletas no desintegrantes de Ácido salicílico.** Determinar el porcentaje disuelto de ácido salicílico bajo las siguientes condiciones:

| Aparato | II (paletas) |
|-------------------------------|---|
| Medio de disolución | Solución amortiguadora de fosfatos 0,05 M de pH 7.4± 0,05 % |
| Velocidad de Agitación | 100 rpm |
| Volumen | 900 mL. |
| Temperatura del medio | 37 ± 0.5 ° C |
| Tiempos de muestreo | 30 minutos |
| Tipo de muestreo | Automatizado |
| Volumen de alícuota | 10 mL. |
| Método de análisis | Espectrofotometria UV 296 nm |

Tabla 3 Condiciones de disolución para tabletas de Ácido salicílico

El aparato de disolución presenta adecuabilidad si cumple con las siguientes especificaciones. Ver Tabla 4

| Tableta | % Disuelto |
|---|-------------------|
| Prednisona (desintegrante) | 37-70 |
| Ácido salicílico (no desintegrante) | 17-25 |

Tabla 4 Especificaciones de adecuabilidad

Recalificación esta es necesaria cuando:

Cuando ha pasado un predeterminado periodo de tiempo, usualmente cada seis meses.

Cuando se realicen reparaciones menores o cambio de partes.

Movimiento o reubicación de cualquier componente ^(5, 14, 18)

2.7 Desarrollo de una prueba perfil de disolución

Dentro de los parámetros que deben ser tomados en cuenta según el Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM 177 SSA1-2008 y la Guidance for Industry “Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms”. Para el diseño de una prueba perfil de disolución son los descritos en la Tabla 5. Además de que se debe realizar el diseño en base a la forma farmacéutica y a las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas del activo. ^(4, 6, 7, 18)

| Diseño de una Prueba de Perfil de Disolución para Formas farmacéuticas de liberación inmediata. | | |
|--|---|---|
| Parámetro | FDA | NOM 177 |
| Aparato de disolución | 1 y 2 | 1 capsulas 2 tabletas |
| Medio de Disolución | Medios de disolución en un rango de pH de 1 a 6.8, con y sin adición de surfactantes. | a) Solución de ácido clorhídrico o fluido gástrico simulado sin enzima. b) Solución reguladora pH 4.5 c) Solución reguladora pH 6.8 o fluido simulado sin enzima. |
| Velocidad de Agitación | Aparato 50-100 rpm Aparato 2: 50-75 rpm | Aparato 1: No se especifica Aparato 2: No se especifica |
| Tiempos de Muestreo | Activos de rápida disolución clase 1 y 3: Intervalos de 5 a 10 minutos hasta caracterizar el perfil Activos de Clase 2: Dos puntos en la ventana de disolución (5 a 15 minutos) y los puntos necesarios para caracterizar el producto (30, 45 y 60 minutos.) | 5 Puntos de Muestreo Fase Ascendente e Inflexión: 3 puntos Fase de meseta: 2 puntos |
| Numero de Unidades Empleadas | 12 | 12 |
| Diferencia en la valoración del principio activo entre el lote de referencia y prueba | No se especifica | 5% |
| Volumen de Alícuotas | No especifica | Con reemplazo: ≤ 10 % Sin reemplazo: ≥ 10 % |

Tabla 5 Parámetros de disolución a evaluar según la FDA y la Norma Oficial Mexicana NOM 177

2.8 Evaluación de perfiles de disolución

Existen diferentes modelos para evaluar si dos perfiles de disolución son diferentes entre, el modelo a utilizar dependerá de la naturaleza de los datos que hayan sido generados mediante el perfil de disolución. Entre los modelos recomendados por la FDA y la SSA se encuentran uno de los siguientes:

Modelo independiente usando el factor de similitud. Dentro de este modelo se encuentran el factor de diferencia f_1 y el factor de similitud f_2 , el primero calcula el % de diferencia entre dos curvas con cada uno de los puntos de muestreo y es una medida de el erro relativo entre dos curvas

$$f_1 = \left\{ \frac{\sum_{t=1}^n |R_t - T_t|}{\sum_{t=1}^n R_t} \right\} \cdot 100$$

Mientras que el factor de similitud es la medida de la similitud en % entre dos curvas de perfil de disolución.

$$f_2 = 50 \cdot \log \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0.5} \cdot 100 \right\}$$

Algunas de las recomendaciones para emplear estos modelos son que:

- Los dos perfiles de disolución debieron ser realizados bajo las mismas condiciones de disolución y empleando los mismo tiempos de muestreo
- Se recomienda tener solamente un punto de muestreo con más del 85% de activo disuelto para ambos productos.
- El coeficiente de variación de los datos del primer punto de muestreo de las doce unidades no debe ser mayor de 20%, mientras que para los otros puntos no debe ser mayor al 10%.
- Para que dos curvas sean consideradas como similares, el valor de f_1 debe ser lo más cercano a 0 y el valor de f_2 debe ser lo más cercano a 100. Generalmente, valores de f_1 arriba de 15 (0-15) y valores de f_2 mayores a 50 (50-100) aseguran una semejanza o equivalencia de dos curvas.^(4, 6, 7, 19, 20, 21)

2.9 Aplicaciones del perfil de disolución

De acuerdo al tipo de especificaciones, las pruebas de disolución se clasifican en tres categorías, de las cuales se derivan diferentes aplicaciones^(7, 6, 22)

- Prueba de disolución de un solo punto. Esta es usada como una prueba rutinaria de control de calidad, en productos farmacéuticos de alta solubilidad y rápida disolución.
- Prueba de disolución de dos puntos. Empleada como prueba rutinaria de control de calidad en cierto tipo de productos farmacéuticos como la Carbamazepina cuya disolución es lenta y su solubilidad en agua es poca. También se usa para caracterizar la calidad de un producto farmacéutico.
- Comparación de perfiles de disolución. Cuyas aplicaciones son:
 1. Para aceptar la semejanza de un producto después de cambios en su composición, manufactura, etc.
 2. Como requerimiento de bioequivalencia para medicamentos con una dosis menor.
 3. Como soporte científico en requerimientos de bioequivalencia.

2.10 Validación del método analítico de disolución.

La validación del método analítico para la prueba de perfil de disolución es necesaria por las siguientes razones:

- Demostrar que el método analítico es adecuado para los análisis propuestos en las condiciones descritas.
- Trabajar con un método que ofrezca confianza y seguridad en los resultados, lo cual a su vez minimiza el número de fallos y repeticiones permitiendo una importante disminución de costos.
- La validación es un paso o requisito previo de los procesos de transferencia de métodos analíticos.

Un procedimiento analítico es la vía por la cual se desarrolla el análisis, en el, se describen detalladamente todos los pasos necesarios para desarrollar cada prueba analítica. Este debe de incluir la(s) muestra(s), el estándar de referencia, la preparación de reactivos, el uso de aparatos, la generación de la curva de calibración, el uso de formulas para los cálculos, etc.

La forma en la que se llevara a cabo la validación del método analítico para los perfiles de disolución del medicamento innovador y el de prueba, será por el método de estándar adicionado, el cual consiste, agregar a cada medicamento cantidades conocidas del fármaco. Este método se emplea cuando no se puede obtener un placebo de los medicamentos a los cuales se les realiza el perfil de disolución.

Parámetros de la validación del método analítico

La validación de un método analítico, tiene que reunir ciertas especificaciones, las cuales se determinan mediante términos llamados parámetros analíticos, estos son: ^(23, 24, 25, 26, 27,28)

a. Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es la capacidad de este (dentro de un rango dado) para arrojar resultados, los cuales son directamente proporcionales a la concentración del analito, en una muestra.

Se determina construyendo una curva de calibración (concentración vs. Respuesta) utilizando 5 niveles de concentración (por ejemplo: 80%, 90%, 100%, 110% y 120%), preparadas a partir de una misma solución patrón (con estándar primario o secundario) y haciendo el análisis cuando menos por triplicado para cada nivel. ^(23, 24, 25, 26, 27,28)

Criterios de aceptación

- El método debe de mostrar una linealidad con al menos 5 puntos (que incluya los puntos extremos excepto el cero) por triplicado.
- Coeficiente de regresión mayor o igual que 0.99 y un error relativo debido a la regresión no mayor que el 3% para el método analítico y 2% para el sistema

b. Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico, se define como la proporcionalidad entre el valor experimental de una prueba individual y el valor verdadero de la prueba. Se expresa en por ciento de recobro y se sobreentiende el 100%.

La exactitud por lo general se establece al preparar muestras múltiples que contengan el fármaco y cualquier otro ingrediente presente en la forma farmacéutica (por ejemplo excipientes, materiales de recubrimiento, cubiertas de cápsulas) con concentraciones que varían de concentraciones por debajo del rango más bajo esperado hasta por arriba de las más altas concentraciones de liberación del fármaco.

En casos de poca solubilidad del medicamento, puede que sea apropiado preparar una solución madre que consiste en la disolución del fármaco en una pequeña cantidad de disolvente orgánico (generalmente que no exceda el 5%) y su dilución a la concentración final del medio de disolución. Se puede agregar al vaso una cantidad de solución madre equivalente a la cantidad declarada, específicamente elegida, en lugar del fármaco en polvo. De la misma manera, en el caso de

concentraciones muy bajas, puede ser más apropiado preparar una solución madre que intentar pesar cantidades muy pequeñas. La medida de recuperación se encuentra normalmente entre 95% y 105% de la cantidad agregada. ^(23, 24, 25, 26, 27,28)

Determinar de, cuando menos, tres placebos cargados de manera independiente con la cantidad necesaria de la sustancia de interés para obtener por lo menos tres concentraciones por ejemplo 90, 100 y 120 %.

Criterios de aceptación

- El promedio del porcentaje de recuperación de los datos de linealidad, no debe variar con respecto a la cantidad nominal en más de 3% en cada punto.
- Coeficiente de variación menor o igual al 3 % para el método y 2% para el sistema.

c. Precisión

Se refiere al grado de concordancia entre los resultados de cada prueba obtenidos a partir de estándares primarios o secundarios por repetición aplicando el método analítico a múltiples muestras de una muestra homogénea. La precisión debe ser considerada en tres niveles que son ^(23, 24, 25, 26, 27,28)

Repetibilidad que es la medida de la concordancia relativa entre determinaciones independientes del analito, bajo las mismas condiciones de análisis, provenientes del muestreo de un material, en el cual el analito está distribuido de manera homogénea. Se expresa en % CV.

Se determina analizando repetidamente (mínimo por sextuplicado) una solución de estándar o una solución de muestra homogénea del producto con la concentración al 100%, bajo las mismas condiciones de operación y por el mismo analista.

Criterios de aceptación

- El coeficiente de variación del porcentaje de recuperación de los datos de precisión no debe ser mayor que el 3% para el método y de 2% para el sistema.

Precisión intermedia. La precisión intermedia puede evaluarse para determinar los efectos de eventos u ocurrencias aleatorias sobre la precisión del procedimiento analítico. Normalmente esta evaluación se realiza cuando el desarrollo de la forma farmacéutica se encuentra avanzado. La precisión puede establecerse en el intervalo completo de las concentraciones del producto. Las variaciones típicas a considerar en un estudio incluyen días, analistas y equipo. Para la evaluación de la precisión intermedia se recomienda el uso de un diseño experimental de matriz. En lo posible, la precisión intermedia puede evaluarse empleando un lote bien caracterizado de un producto farmacéutico con estrecha uniformidad de contenido. ^(23, 24, 25, 26, 27,28)

Se determina analizando repetitivamente (mínimo por triplicado) una muestra homogénea del producto a una concentración del 100%, por lo menos en dos días diferentes.

Criterios de aceptación

- El coeficiente de variación global no debe ser mayor que el 3% para el método y del 2% para el sistema.
- F calculada es menor que F teórica por lo tanto Ho (el análisis en diferentes días no es significativamente diferente) es aceptada.

Reproducibilidad es la expresada como la precisión entre laboratorios (colaboración de estudios, usualmente aplicada para la estandarización de metodologías.

d. Estabilidad de la muestra

Es la propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su identidad fisicoquímica y de la concentración de la sustancia de interés, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Se determina mediante la comparación de los resultados de los análisis iniciales de tres muestras con los obtenidos de las muestras después de permanecer durante un tiempo en diferentes condiciones. El intervalo típico aceptable para la estabilidad de la solución muestra puede encontrarse entre 98% y 102% comparado con el análisis inicial de las soluciones de muestra^(5, 29, 30, 31)

e. Selectividad.

Es necesario para demostrar que los resultados no están indebidamente afectados por los ingredientes del placebo, otros fármacos activos o productos de degradación.

El placebo está constituido por todos los excipientes y recubrimientos (colorantes, dispositivos de sumersión y cubiertas de cápsulas se incluyen también cuando corresponda) sin él ingrediente activo. La interferencia del placebo puede determinarse pesando las muestras de la mezcla del placebo y disolviéndolas o dispersándolas en el medio de disolución a las concentraciones que se puedan encontrar durante la prueba. Con este parámetro analítico se demuestra la selectividad del método para el fármaco entre otros componentes de la muestra, cualquier interferencia, no debe producir un error mayor al aceptado en precisión y exactitud.

Si la interferencia del placebo excede de 2%, entonces puede requerirse, para evitar la interferencia, una modificación del método tales como (1) elegir otra longitud de onda, (2) sustraer la línea base empleando una longitud de onda mayor o (3) utilizar HPLC.^(23, 26)

f. Evaluación del filtro.

La validación del filtrado se realiza para demostrar el filtro empleado durante el proceso de filtrado no se pierda o retenga el analito de interés en el filtro

Para soluciones estándar comparar los resultados de las soluciones filtradas, con las soluciones sin filtrar y la diferencia no debe ser mayor al 2%.^(4, 5)

2.11 Monografía de Amlodipino.

2.11.1 Historia de los bloqueadores de canales de Ca^{2+} . En 1962, Hass y Hartfelder observaron que el Verapamilo, un derivado del espasmolítico papaverina, poseía efectos vasodilatadores coronarios y efectos cronotrópicos e inotrópicos negativos. Sin embargo, la nitroglicerina, otro potente vasodilatador coronario, carecía de esos efectos cardíacos. En 1967, Fleckenstein sugirió que dichos efectos se debían a la inhibición del proceso de acoplamiento excitación-contracción, como consecuencia de la reducción de la entrada de Ca^{2+} desde el exterior hacia el interior del miocito cardíaco, a través de los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje. Hoy se conocen múltiples fármacos que, si bien gozan de un mecanismo de acción común, como es bloquear los canales de Ca^{2+} del subtipo L, a nivel cardíaco y en la fibra lisa vascular y no vascular, poseen estructuras químicas muy diversas. Estos fármacos son denominados bloqueantes de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje de subtipo L, o simplemente antagonistas del calcio. Pertenecen a tres grupos fundamentales ^(18, 32, 33, 34)

Las 1,4-dihidroperidinas en donde podemos encontrar al Nifedipino y Amlodipino.

- Las bencilalquilaminas cuyo prototipo es el Verapamilo.
- Las benzodiazepinas cuyo representante es el Diltazem

2.11.2 Estructura química

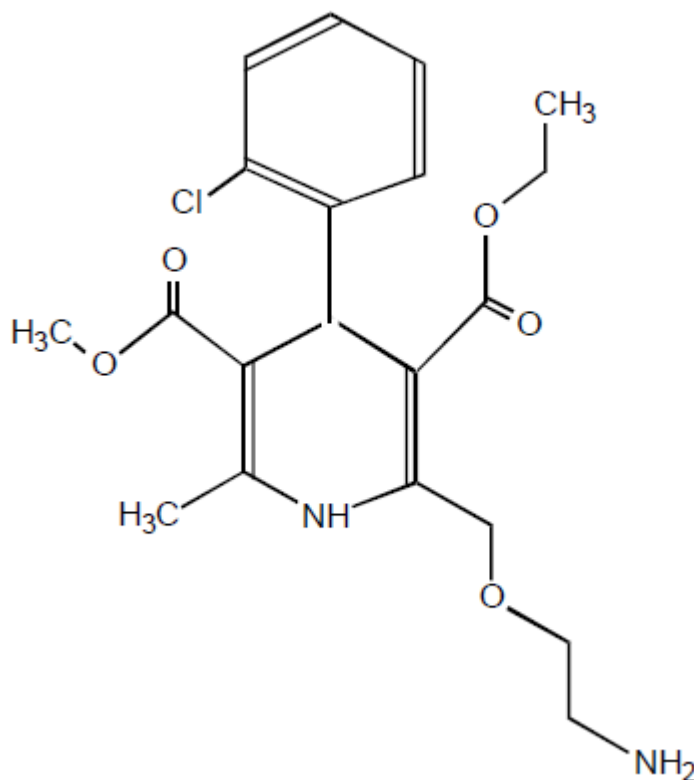


Figura 3 Estructura química del Amlodipino.

Amlodipino. 2-[(2-Aminoetoxi) metil]-4-(2-clorofenil)-1,4-dihidro-6-metil-3,5-acido piridenacarboxílico 3 etil 5-metil ester; (\pm)-2-[(2-aminoetoxi) metil]-4-(2-clorodenil)-3-etoxicarbonil-5-metoxicarbonil-6-metil-1,4-dihidropiridina.

Peso molecular: 408.88 gramos/mol

Formula: Amlodipino $C_{20}H_{25}ClN_2O_5$

2.11.3 Propiedades fisicoquímicas:

Polvo blanco. Ligeramente soluble en agua, poco soluble en etanol, fácilmente soluble en metanol y con un pKa de 8.6
Condiciones de almacenamiento. Proteger de la luz y almacenar en contenedor hermético.

Forma farmacéutica: Tabletas

Presentaciones:

-NORVAS® (Besilato de Amlodipino) tableta 2.5, 5 y 10 mg.

2.11.4 Indicaciones terapéuticas: el Amlodipino está indicado como tratamiento inicial de primera opción en la hipertensión arterial y puede usarse como terapia para el control de la presión sanguínea en la mayoría de los pacientes.

Aquellos enfermos que no estén adecuadamente controlados con un solo antihipertensivo pueden beneficiarse al agregar Amlodipino, el cual se ha utilizado en combinación con diuréticos tiazídicos, agentes bloqueadores de los adrenoreceptores beta, bloqueadores alfa, o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.

El Amlodipino está indicado para el tratamiento como primera elección en la isquemia del miocardio. El Amlodipino puede utilizarse en aquellos casos donde el cuadro clínico inicial sugiera un posible complejo vasoespasmo/vasoconstricción, aunque éstos no se tienen confirmados. El Amlodipino puede utilizarse como terapia, o en combinación con otro medicamento en casos de pacientes con angina refractaria

2.11.5 Propiedades farmacológicas:

Mecanismo de acción.

Uno de los mensajeros intracelulares más ubicuos y con mayor protagonismo en los procesos de regulación celular es el Ca^{2+} pues regula una gran variedad de procesos como la contracción de los músculos estriados, liso, y cardíaco. Las indicaciones terapéuticas del Amlodipino se basan en sus efectos sobre la homeostasia celular del calcio en los músculos liso vascular y estriado cardíaco.

El mecanismo de acción del Amlodipino está estrechamente relacionado con la multiplicidad de canales de Ca^{2+} por los que el catión accede al interior celular para regular las distintas funciones biológicas en las que este mensajero está implicado. Las técnicas utilizadas para la identificación y el análisis de canales iónicos han sido muy diversas: radioligandos específicos, sondas fluorescentes, estudios funcionales y biología molecular. Sin embargo gracias a las técnicas electrofisiológicas de patch-clamp, el avance experimentado en la última década en la catalogación y caracterización de decenas de canales iónicos en distintos sistemas celulares ha sido espectacular. Con el uso de estas técnicas se han llegado a identificar hasta seis subtipos de canales de Ca^{2+} que se denominan con las letras L, N, P, Q, T y R. La distinción entre estos canales se lleva a cabo sobre la base de sus propiedades cinéticas de apertura y cierre. En el caso de los canales L que es el tipo de canal en el que actúa el Amlodipino tiene una cinética de inactivación muy alta (>200 mseg). No obstante, los canales de Ca^{2+} se diferencian, sobre todo, gracias a su distinta sensibilidad a fármacos. Los canales L se encuentran en neuronas y en otras células como miocitos cardíacos, células musculares lisas vasculares y no vasculares y células endocrinas.

Los canales de Ca^{2+} del subtipo L son heterómeros formados por subunidades α_1 , α_2 , β , γ y δ . La subunidad α_1 contiene el poro iónico y los sitios de unión para los antagonistas del calcio. Los efectos hemodinámicos de los antagonistas del calcio se deben al bloqueo de los canales de Ca^{2+} del tipo L del corazón y vasos. Para bloquear los canales de Ca^{2+} del subtipo L, los antagonistas del calcio presentan dependencia del uso y dependencia del voltaje, la dependencia del uso se refiere a que a mayor número de veces se abra el canal más bloqueo habrá, en el caso de dihidropiridinas el bloqueo es menos dependiente de la frecuencia o uso en comparación con el Verapamilo y el Diltiazem. El otro aspecto interesante es la dependencia del voltaje. El potencial de membrana de las células de Purkinje, es de -90 mV en situaciones normales; el potencial de membrana es mucho más despolarizado (alrededor de -60 mV) en las células de los nodos sinoauricular y auriculoventricular, así como en el miocardio isquémico y en el músculo vascular normal. El hecho de que los antagonistas del calcio bloqueen mejor los canales del subtipo L a potenciales más despolarizados (dependencia del voltaje) explica su mayor afinidad por las células musculares vasculares y por las células nodales. De ahí que Amlodipino puede producir vasodilatación a concentraciones que apenas modifican la contractibilidad miocárdica, la frecuencia sinusal o la conducción auriculoventricular.

Farmacocinética y metabolismo: después de administración oral a dosis terapéuticas de la absorción produce concentraciones pico entre 6 y 12 horas. La biodisponibilidad absoluta ha sido estimada entre 64 y 90 %. El volumen de distribución es de aproximadamente 21 L/Kg. La absorción de Amlodipino no se ve afectada por la presencia de comida. Las concentraciones plasmáticas en estado estable se alcanzan después de 7-8 días de administración continua.

Amlodipino es ampliamente (alrededor del 90%) transformado a metabolitos inactivos vía hepática, excretándose en la orina el 10% del compuesto original y 60% como metabolitos. La eliminación del plasma es bifásica con una vida media de eliminación terminal de alrededor de 30 a 50 horas.

Los parámetros farmacocinéticos de Amlodipino no son influenciados significativamente por daño renal. Pacientes jóvenes y con daño hepático presentan un descenso en el aclaramiento de Amlodipino con un incremento en el ABC de un 40-60% aproximadamente, siendo necesario un reajuste en la dosis inicial.

Contraindicaciones: el Amlodipino está contraindicado en pacientes con sensibilidad conocida a las dihidropiridinas, Amlodipino o los excipientes contenidos en su formulación.^(18, 32, 33, 34)

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Durante los últimos 10 años el registro de medicamentos genéricos intercambiables (GI) en México ha ido en aumento, siendo necesarias las pruebas de disolución para los medicamentos que son susceptibles a ser GI o de los cuales ya hay genéricos en el mercado.

No todos los medicamentos de los cuales existe un genérico cuentan con la prueba de perfil de disolución en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, ni en otras farmacopeas internacionales; tal es el caso de Amlodipino un medicamento empleado para el tratamiento de hipertensión arterial una de las principales causa de consulta en el IMSS. Por lo cual es fundamental el desarrollo de una metodología de prueba de perfil disolución la cual debe estar debidamente diseñada. Además de que la Secretaría de Salud pide como requisito para intercambiabilidad de tabletas de Amlodipino la prueba C la cual se constituye de la realización de un perfil de disolución así como pruebas de biodisponibilidad.

El diseño de una prueba de perfil de disolución adecuada para cada medicamento es necesaria ya que esta es una herramienta que nos asegura que un medicamento genérico y un medicamento de patente tienen el mismo comportamiento in vitro, y así poder establecer una correlación in vitro-in vivo si es posible y también es empleada como estándar para evaluar la liberación del fármaco en formar farmacéuticas sólidas de liberación inmediata durante la etapa de desarrollo.

4. Objetivos

Objetivo General

- Diseñar una metodología de prueba de perfil de disolución para tabletas de Amlodipino de liberación inmediata.

Objetivos Específicos:

- Desarrollar un método analítico para cuantificar Amlodipino en la prueba de perfil de disolución.
- Establecer las condiciones óptimas para llevar a cabo el perfil de disolución de tabletas de Amlodipino.
- Validar la metodología de prueba de disolución para Amlodipino.
- Comparar una nueva formulación de Amlodipino contra el producto innovador mediante la prueba de perfil de disolución.

5. Hipótesis

Al desarrollar una prueba de perfil de disolución y estableciendo las condiciones óptimas de disolución, se podrá evaluar diferentes formulaciones de tabletas de Amlodipino de liberación inmediata, basándose en su comportamiento in vitro.

6. Material y metodología.

6.1.-Equipo

- Balanza analítica OHAUS Adventure.
- HPLC Varian® modelo 410
- Disolutor USP II Varian® Modelo VK 7025
- Automuestreador Varian© modelo VK8000
- Potenciómetro
- Parrilla de calentamiento y Agitación Cimarec
- Sonicator ultrasonic cleaner AS10200B
- Bomba de vacío rocker 6000

6.2.-Material

- Matraz aforado 10, 25, 50, 100, 200, 500 y 1000 mL.
- Mortero de porcelana con pistilo
- Vasos de precipitados de 50, 100, 150, 200, 600, 1000 mL
- Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, 10 mL
- Viales con tapa de PTFE/ silicona
- Tubos de ensayo 13x100
- Termómetro
- Matraz kitazato con aditamentos para filtración
- Columna para HPLC Kromasil L1 3.9 X 150 mm
- Bureta volumétrica de 25 mL.
- Soporte universal.
- Pinzas dobles para bureta.
- Jeringas de plástico de 10 mL.
- Filtros de Nylon de 0.45 mm con un diámetro de 13 µm. Marca Millipore©
- Filtros Full Flow marca Varian© de 0,35 µm
- Unidad de Ultrafiltración de 2 litros marca Wheaton

6.3.-Reactivos

- Metanol grado HPLC
- Acido acético glacial RA
- Agua grado HPLC y destilada.
- Acido clorhídrico RA
- Acetonitrilo grado HPLC
- Trietilamina RA
- Estándar de Besilato de Amlodipino
- Fosfato monobásico de potasio. RA
- Hidróxido de sodio RA
- Acido fosfórico. RA
- Materia prima estandarizada: Besilato de Amlodipino Lote AB/002/5042
- Estándar primario USP: Besilato de Amlodipino Lote GOF 133

6.4 METODOLOGIA

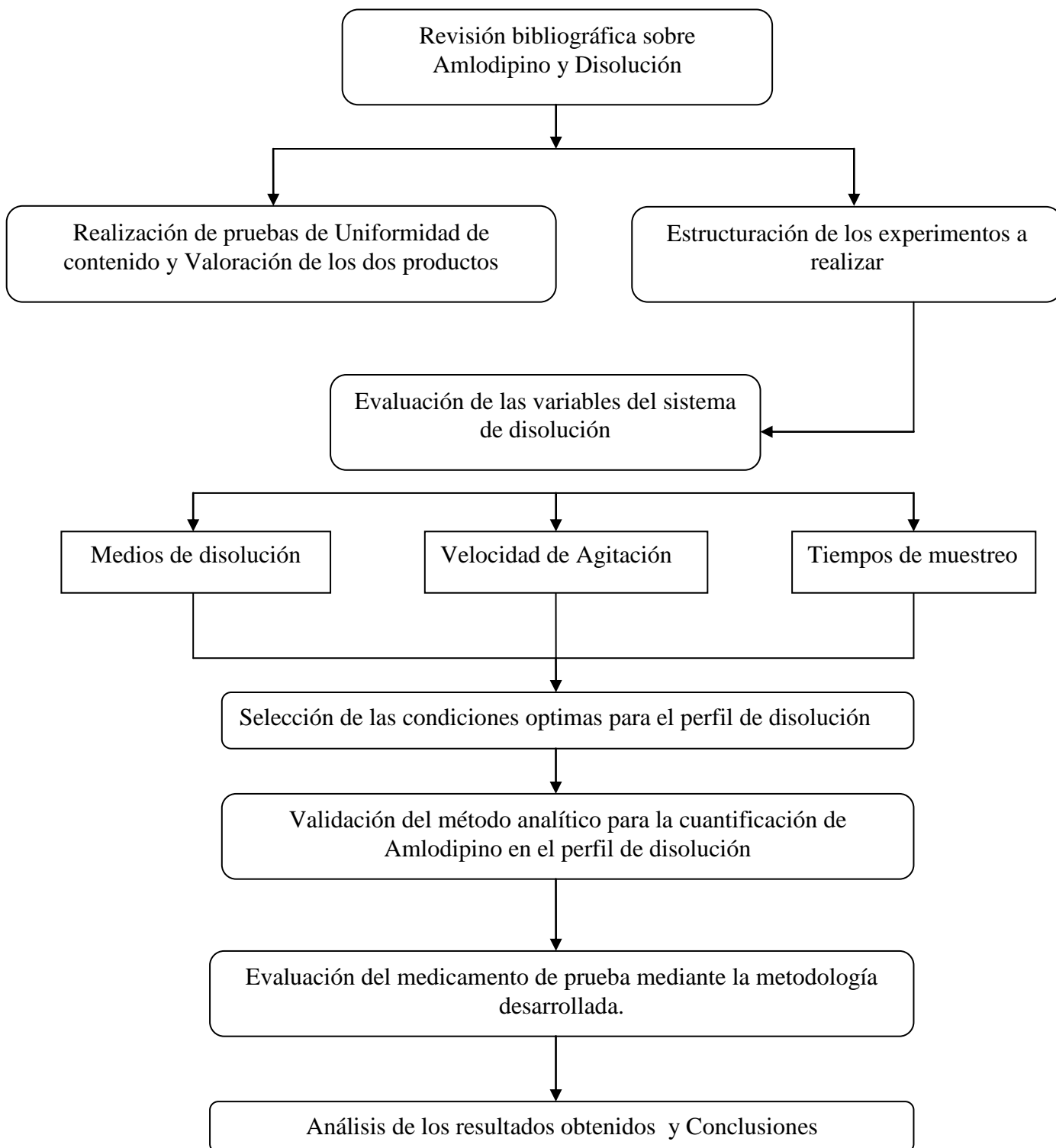


Figura 1 Metodología

6.5. Preparación de Soluciones y medios de disolución.

Preparación de la fase móvil.

La fase móvil está compuesta por (Acetonitrilo: Metanol: solución de trietilamina) 15:35:50 v/v

Solución de Acetonitrilo: Metanol (15:35) v/v: Medir 350 mL. de Metanol y 150 mL. de acetonitrilo grado HPLC de manera separada, mediante una probeta de 500 mL. y transferirlos a matraz erlenmeyer de 2 litros. Mezclar y filtrar la solución a través de membrana de PVDF de .45 μm . mediante una unidad de ultrafiltración.

Solución de trietilamina: En un matraz volumétrico de 1 L. colocar 950 mL. de agua grado HPLC y agregar 7 mL. de trietilamina, ajustar el pH a 3 ± 0.1 con ácido fosfórico (H_3PO_4), para después llevar al aforo con agua grado HPLC. Por último filtrar a través de membrana de PVDF de .45 μm .

Preparación de la solución de lavado del inyector del HPLC.

Medir por separado 100 mL. de metanol y agua grado HPLC mediante una probeta de esa capacidad y mezclar en un matraz erlenmeyer de 250 mL. por último filtrar la solución a través de una membrana de PVDF de 0.45 μm .

Preparación de los medios de disolución: Los medios de disolución fueron preparados según la FEUM 8°

Solución de ácido clorhídrico 0,1 N: En un matraz volumétrico de 1000 mL., depositar 200 mL. de agua destilada, agregar lentamente 8,5 mL. de ácido clorhídrico. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua.

Solución de ácido clorhídrico 0,01 N: En un matraz volumétrico de 1000 mL., depositar 20 mL. de agua destilada, agregar lentamente 0,85 mL. de ácido clorhídrico. Enfriar a temperatura ambiente y llevar a volumen con agua.

Solución reguladora pH 4.5 (fosfato monobásico de potasio): En un matraz volumétrico de 1000 mL. Disolver 13,61 g de fosfato monobásico de potasio en 750 mL. de agua. Si es necesario ajustar el pH con solución de hidróxido de sodio 0,1 M, o con ácido clorhídrico 0,1 M. Llevar a volumen con agua.

Solución reguladora pH 6.8 (fosfato monobásico de potasio-hidróxido de sodio): En un matraz volumétrico de 1000 mL., mezclar 250 mL. de solución de fosfato monobásico de potasio 0,2 M, con 118,25 mL. de solución de hidróxido de sodio 0,2 M. Llevar a volumen con agua.

El método empleado para la desgasificación de los medios de disolución es el siguiente: calentar a 45 °C el medio de disolución e inmediatamente filtrar al vacío mediante una unidad de ultrafiltración, usando un filtro de 0,45 μ y agitando vigorosamente durante 5 minutos.

6.6.- Evaluación inicial de los productos farmacéuticos de estudio.

Para la evaluación de los perfiles de disolución se emplearon los siguientes productos:

| TIPO DE MEDICAMENTO | FUENTE | LOTE | NOMBRE COMERCIAL | FECHA DE CADUCIDAD |
|---------------------|----------|------------|------------------|--------------------|
| Referencia | DONACIÓN | 7180530001 | Norvas | MAR 11 |
| Prueba | DONACIÓN | AMD01 | - | - |

Tabla 1 Información de los medicamentos

Como parte del estudio de disolución a los medicamentos se les realizó la prueba de valoración y uniformidad de contenido conforme a la Farmacopea Británica 2007.

Métodos farmacopeicos

Valoración

Solución de referencia(A): Pesar una cantidad de Besilato de Amlodipino equivalente a 50 mg de Amlodipino, disolver y llevar al aforo con fase móvil en un matraz de 50 mL.

Solución de referencia (B): Transferir una alícuota de 5 ml de la solución de referencia B, en un matraz aforado de 100 mL. y llevar al aforo con fase móvil obteniendo una concentración de 50 µg/mL.

Solución de prueba(A): Pesar y pulverizar finamente no menos de 20 tabletas. Después transferir una porción de polvo pesada con exactitud que equivalga a 50 mg de Amlodipino, a un matraz de 50 mL., agregar 30 ml de fase móvil y sonicar 10 minutos, dejar enfriar y se diluir a 50 ml con fase móvil.

Solución de prueba (B): Transferir una alícuota de 5 mL. de la solución de prueba A, en un matraz volumétrico de 100 mL. y llevar al aforo con fase móvil, obteniendo una concentración de 50 µg/mL.

| Condiciones de Análisis de Amlodipino. | |
|---|---|
| Columna | Kromasil 5 u C18 39mm x 150 mm |
| Temperatura de la columna | 35°C |
| Detección | 237 nm UV |
| Velocidad de flujo | 1.0 mL. /min. |
| Volumen de Inyección | 10 µL. |
| Fase móvil. | Acn:MeOH: Solución de trietilamina (15:35:50 v/v) |
| Solución de lavado del inyector | MeOH: Agua (50/50 v/v) |

Tabla 2 Condiciones cromatograficas para la valoración de tabletas de Amlodipino.

Procedimiento: Inyectar seis veces la solución de referencia B y dos veces la solución de prueba B.

Uniformidad de Contenido

Seleccionar no menos de 30 unidades, de las cuales se escogen y pesan al azar 10 tabletas. Posteriormente valorar de manera individual cada una de las unidades de la siguiente manera:

Solución de prueba: Colocar de manera individual las 10 tabletas pesadas en matraces volumétricos de 100 mL. , se adicionar 30 mL. de fase y sonicar durante 10 minutos para disolver. Luego se dejar enfriar a temperatura ambiente y llevar al aforo con fase móvil (esta solución tiene una concentración de 50 µg/mL.). Posteriormente filtrar con una membrana de nylon .45 µm o equivalente las muestras a inyectar.

Solución de referencia: Usar la solución de referencia B como se indica en el método de valoración.

Condiciones de prueba y procedimiento: Aplicar las mismas condiciones que en la valoración.

Calculo del valor de aceptación: calcular el valor de aceptación mediante la fórmula:

$$DER= 100 S/\bar{X}.$$

Donde:

DER= Desviación estándar de la muestra.

X= media de los contenidos individuales (X1. X2.....Xn), expresados como el porcentaje de la cantidad declarada.

s= desviación estándar de la muestra

6.7.-Perfiles de disolución

Para las pruebas de perfil de disolución se emplearon 12 tabletas del producto de prueba por cada una de las condiciones a evaluar.

| Aparato | II (paletas) |
|-------------------------------|--|
| Medio de disolución | 1) Solución 0,1 N de ácido clorhídrico o fluido gástrico simulado enzima. 2) Solución 0,01 N de ácido clorhídrico 3) Solución reguladora pH 4,5. 4) Solución reguladora pH 6,8 o fluido intestinal simulado sin enzima. |
| Velocidad de Agitación | 50 rpm, 75 rpm |
| Volumen | 500 mL. |
| Temperatura del medio | 37 ± 0.5 ° C |
| Tiempos de muestreo | 5, 10, 15, 20, 30, 45 y 60 |
| Tipo de muestreo | Automatizado |
| Volumen de alícuota | 5 mL. |
| Método de análisis | CLAR. |

Tabla 3 Parámetros a evaluar en las pruebas de perfil de disolución.

Procedimiento:

Pesar las 12 tabletas a utilizar para la realización del perfil de disolución, llenar el baño del disolutor hasta la marca indicada y calentar a una temperatura de 37° C.

Preparar y desgasificar el medio de disolución a emplear, como se indica en el numeral 4.5, una vez listo el medio de disolución colocar 500 mL. en cada uno de los vasos de disolución y esperar que la temperatura de los 6 vasos sea de 37 ± 0.5 °C, programar el disolutor con las condiciones a evaluar, colocar las tabletas en los dispensadores del disolutor e iniciar la prueba.

Para el análisis de las alícuotas tomadas en cada uno de los tiempos de muestreo de los diferentes medios de disolución se emplearan las siguientes condiciones de análisis en el equipo HPLC.

| | |
|----------------------------------|--|
| Detección: | UV a 237 nm |
| Columna | Kromasil 5 u C18 39mm x 150 mm |
| Temperatura de la columna: | 35 °C |
| Velocidad de flujo: | 1.0 mL./min |
| Volumen de inyección: | 100 µL |
| Temperatura del automuestreador: | Ambiente |
| Diluyente: | Medio de disolución empleado |
| Fase móvil: | ACN: Solución de Trietilamina: MeOH (15:50:35 v/v/v) |
| Solución de lavado del inyector: | MeOH: Agua (50:50 v/v) |

Tabla 4 Condiciones cromatograficas para la cuantificación de Amlodipino en los perfiles de disolución.

Calcular el % disuelto en cada uno de los vasos en los diferentes tiempos de muestreo, calcular el promedio del % disuelto en cada uno de los tiempos y elaborar una grafica del % disuelto de Amlodipino vs tiempo.

Determinar cuáles son las mejores condiciones para llevar a cabo el perfil de disolución mediante el cálculo de %CV, eficiencia de disolución y la caracterización del perfil de disolución.

A demás de las condiciones anteriores se deben cumplir los siguientes criterios y requisitos especificados de la NOM 177-SSA1-1998:

- Utilizar como medicamento de referencia el indicado por la Secretaria a través del área competente, el cual debe estar comercialmente disponible y vigente.
- Los medicamentos de prueba y de referencia deben tener al menos un año de vigencia antes de su fecha de caducidad al momento de realizar el estudio.
- El porcentaje de valoración del medicamento de prueba debe estar dentro de los límites farmacopeicos no debe diferir en más del 5 % del medicamento de referencia.
- Utilizar sustancias de referencia trazables con patrones de referencia de reconocimiento nacional o internacional.

6.8 Validación del método analítico para la cuantificación de Amlodipino en un perfil de disolución.

Validación del sistema.

Linealidad.

Preparación de la solución stock: Pesar 70 miligramos de Besilato de Amlodipino equivalentes a aproximadamente 50 miligramos de Amlodipino y colocarlos en un matraz volumétrico de 500 mL. Agregar 400 mL de medio de disolución (ácido clorhídrico 0.01 N) y sonicar durante 5 minutos, llevar al aforo con el medio de disolución y preparar las siguientes soluciones por triplicado como indica la tabla.

| NIVEL | (%)LICUOTA DE SOLUCION STOCK DE AMLODIPINOLUMEN DEL MATR (mL.) | CONCENTRACIÓN DE DE AMLODIPINO (µg/mL.) |
|-------|--|---|
| 40 | 2 | 4 |
| 60 | 3 | 6 |
| 80 | 4 | 8 |
| 100 | 5 | 10 |
| 120 | 6 | 12 |

Tabla 5 Linealidad del sistema.

Las alícuotas son medidas mediante una bureta volumétrica de 25 mL.

Por último filtrar una porción de las soluciones preparadas mediante un filtro nylon de 0,45 µm, transferir a viales e inyectar una vez al sistema cromatografico.

Precisión.

Para la evaluación del método se preparo la una solución stock de la misma manera que para la linealidad. A partir de la solución anterior preparar por triplicado una solución con una concentración de 10 µg/mL. de la siguiente manera: medir y transferir una alícuota de 5 mL de la solución stock mediante una bureta volumétrica de 25 mL. , a un matraz de 50 mL. y en seguida llevar al aforo con medio de disolución.

Filtrar una porción de la solución anterior mediante un filtro de membrana de nylon de 0.45 um y transferir a viales e inyectar por sextuplicado cada una de las soluciones al sistema cromatografico.

Validación del método.

La validación del método solamente se llevo a cabo en el medio de disolución de HCl 0.01 N debido a que con este medio se obtuvieron los mejores resultados, y por cuestiones de optimización de recursos no se realizaron pruebas de validación en los otros medios de disolución empleados, sin embargo en cada de los análisis realizados en los tres medios de disolución siempre se llevo a cabo la prueba de System Suitability con lo que se garantiza la validez y confiabilidad de los datos generados en estos experimentos.

Linealidad.

La linealidad del método del producto de referencia y del producto de prueba se realizo mediante el método del estándar adicionado esto debido a que no se contaba con los excipientes de cada una de las formulaciones.

Para la linealidad del método se prepararon las siguientes soluciones:

Solución stock del producto (Prueba y referencia.). Para la preparación de la solución stock se pesaron 20 tabletas del producto y se calculo el peso promedio, enseguida se pulverizaron finamente. Después se peso una cantidad

equivalente a 10 mg de Amlodipino y se transfirió a un matraz volumétrico de 100 mL, se adicionaron 5 mL de metanol grado HPLC y se sónico durante 5 minutos, después se llevo al aforo con medio de disolución y se prepararan las siguientes soluciones.

| NIVEL (%) | alícuota de solución prueba (C). | alícuota de la solución stock $\mu\text{g/mL}$. | volumen del mat | CONCENTRACIÓN AMLODIPINO ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------|----------------------------------|--|-----------------|---|
| 40 | 3 | 1mL. | 100 | 4 |
| 60 | 3 | 3mL. | 100 | 6 |
| 80 | 3 | 5mL. | 100 | 8 |
| 100 | 3 | 7mL. | 100 | 10 |
| 120 | 3 | 9mL. | 100 | 12 |

Tabla 6 Linealidad del método.

Evaluación de filtro:

Se llevo a cabo una prueba de disolución de una de las tabletas del producto de referencia y del producto de prueba bajo las siguientes condiciones:

| Aparato | II (paletas) |
|------------------------|--|
| Tipo de filtro | Filtro de teflón de 35 μm . |
| Medio de disolución | Solución 0,01 N de ácido clorhídrico o fluido gástrico simulado sin enzima |
| Velocidad de Agitación | 50 rpm |
| Volumen | 500 mL. |
| Temperatura del medio | 37 \pm 0.5 ° C |
| Tiempo de prueba | 45 min. |
| Tipo de muestreo | Automatizado |
| Volumen de alícuota | 5 mL. * |
| Método de análisis | CLAR. |

*Sin reposición de medio.

Tabla 7 Condiciones de la prueba de disolución.

Después de finalizada la prueba se tomaron seis alícuotas de 5 mL. con y sin filtro, del producto de prueba y del producto de referencia y se inyectaron al sistema cromatografico.

Estabilidad de las soluciones.

Para la evaluación de la estabilidad de la muestra se analizo una solución de estándar de Amlodipino con una concentración de 10 microgramos /mL. en un periodo de 2 y 24 horas a una temperatura de 5°,esto debido a que el Amlodipino es muy inestable por lo que de preferencia se deberá analizar en el mínimo tiempo necesario.

7. Resultados y discusión de resultados

7.1.-Pruebas de control de calidad. En las pruebas de control de calidad los resultados obtenidos en la valoración son satisfactorios ya que se cumple con las especificaciones de la valoración (90-110%) y de la uniformidad de contenido (85-115% con una DER < 6%) como producto terminado y además se cumple con el requisito de la NOM 177 la cual pide que la diferencia entre el resultado de la valoración del medicamento de prueba y del medicamento de referencia sea menor al 5%, ya que se obtuvo una diferencia del 2.3%.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de valoración y uniformidad de contenido de los productos bajo estudio.

| PRODUCTO | LOTE | VALORACIÓN | UNIFORMIDAD DE CONTENIDO. |
|------------|------------|----------------------|---------------------------|
| Referencia | 7180530001 | 97,2 % n=3 DER 0.134 | 93,3% n=10 y DER 1,6 % |
| Prueba | AMD01 | 94,9% n=3 DER 0.406 | 96,4% n=10 y DER 3,7 % |

Tabla 1 Resultados de la pruebas de control de calidad.

7.2.-Evaluación de los perfiles de disolución en diferentes medios de disolución a 75 rpm.

En el estudio de perfil de disolución en HCl 0,01 N las tabletas de Amlodipino del producto de prueba presentan una disolución rápida ya que al primer punto de muestreo se tiene más del 85% disuelto y con los siguientes puntos de muestreo se observa una meseta, lo que no permite caracterizar la curva en la parte ascendente, mientras que en los tres medios de disolución restantes se observa un comportamiento similar pero con un porcentaje disuelto menor a 85%. Los medios disolución que presentaron una mayor eficiencia de disolución son el HCl 0.01 N y la solución reguladora pH 4.5 por tal razón se continuara la experimentación con estos dos medios de disolución.

| Medio de Disolución | % Eficiencia de Disolución |
|-------------------------------|----------------------------|
| HCl 0,01 N | 90.2 |
| HCl 0,1 N | 79.8 |
| Solución reguladora pH 4,5 | 82.7 |
| Solución reguladora pH 6,8 | 74.0 |

Tabla 2 Eficiencia de disolución obtenida en cada medio de disolución a un tiempo de 60 minutos.

| Medio de disolución | TIEMPO DE MUESTREO EN MINUTOS | | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|------|------|------|-------|
| | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| HCl 0,01 N | 91.3 | 98.0 | 99.3 | 99.0 | 100.1 |
| HCl 0,1 N | 81.9 | 86.6 | 87.3 | 87.4 | 87.0 |
| Solución reguladora pH 4,5 | 77.4 | 86.4 | 91.6 | 94.3 | 95.4 |
| Solución reguladora pH 6,8 | 66.6 | 76.5 | 81.5 | 85.5 | 89.0 |

Tabla 3 Valores promedio del % disuelto a los diferentes tiempos de muestreo en cada uno de los medios de disolución del producto de prueba en Aparato II

| Medio de disolución | TIEMPO DE MUESTREO EN MINUTOS | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|------|------|------|------|
| | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| HCl 0,01 N | 3.27 | 3.36 | 2.77 | 2.86 | 2.31 |
| HCl 0,1 N | 3.31 | 6.02 | 5.14 | 6.12 | 5.52 |
| Solución reguladora pH 4,5 | 3.35 | 2.90 | 1.96 | 1.39 | 1.37 |
| Solución reguladora pH 6,8 | 1.67 | 2.26 | 2.63 | 2.09 | 2.04 |

Tabla 4 Valores de %CV del porcentaje disuelto en los diferentes tiempos de muestreo.

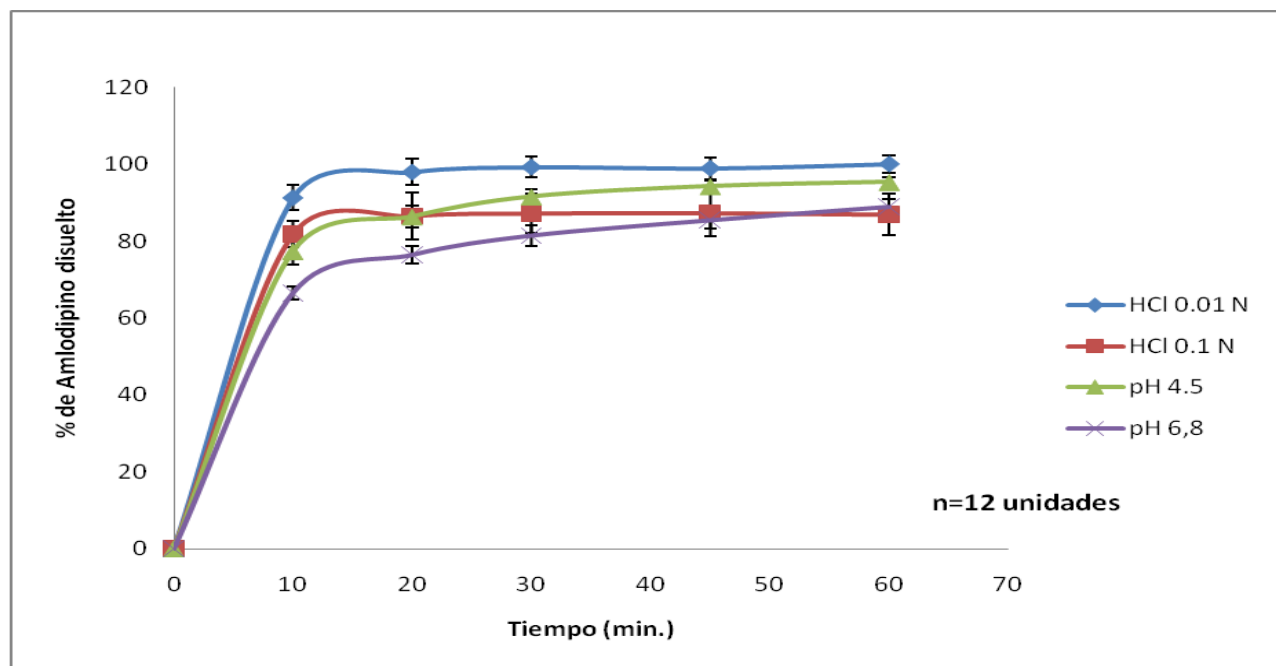


Figura 1 Perfiles de disolución de tabletas de Amlodipino lote AMD01 en diferentes medios de disolución. (n= número de unidades de prueba usadas por perfil)

7.3.-Evaluación de los perfiles de disolución a disolución a 50 rpm. En los perfiles de disolución realizados en HCl 0,01 N y solución reguladora de pH 4,5 a una velocidad de agitación de 50 rpm se obtuvo una menor eficiencia de disolución en los dos medios, prevaleciendo una mayor eficiencia de disolución en el HCl 0,01 N con un valor de 81.1%, mientras que en la solución reguladora se obtuvo una eficiencia de 74.3%. Observándose menores coeficientes de variación en ácido clorhídrico 0.01 N por lo que se decidió seleccionar este medio por que es más reproducible.

| Medio de disolución | TIEMPOS DE MUESTREO EN MINUTOS | | | | |
|----------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|
| | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| Solución Reguladora pH 4.5 | 58.3 | 75.4 | 84.3 | 91.5 | 93.0 |
| HCl 0,01 N | 71.3 | 87.4 | 92.4 | 94.4 | 94.7 |

Tabla 5 Valores promedio del % disuelto a los diferentes tiempos de muestreo en HCl 0,01 N y solución reguladora pH 4,5 a una velocidad de agitación de 50 rpm.

| Medio de disolución | Tiempos de Muestro (min.) | | | | | % CV Promedio |
|----------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------|
| | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 | |
| HCl 0,01 N | 4.4 | 3.2 | 2.5 | 2.0 | 1.6 | 2.7 |
| Solución reguladora pH 4.5 | 7.3 | 6.3 | 4.6 | 3.5 | 2.6 | 4.9 |

Tabla 6 Valores de %CV del porcentaje disuelto en los diferentes tiempos de muestreo con una agitación de 50 rpm.

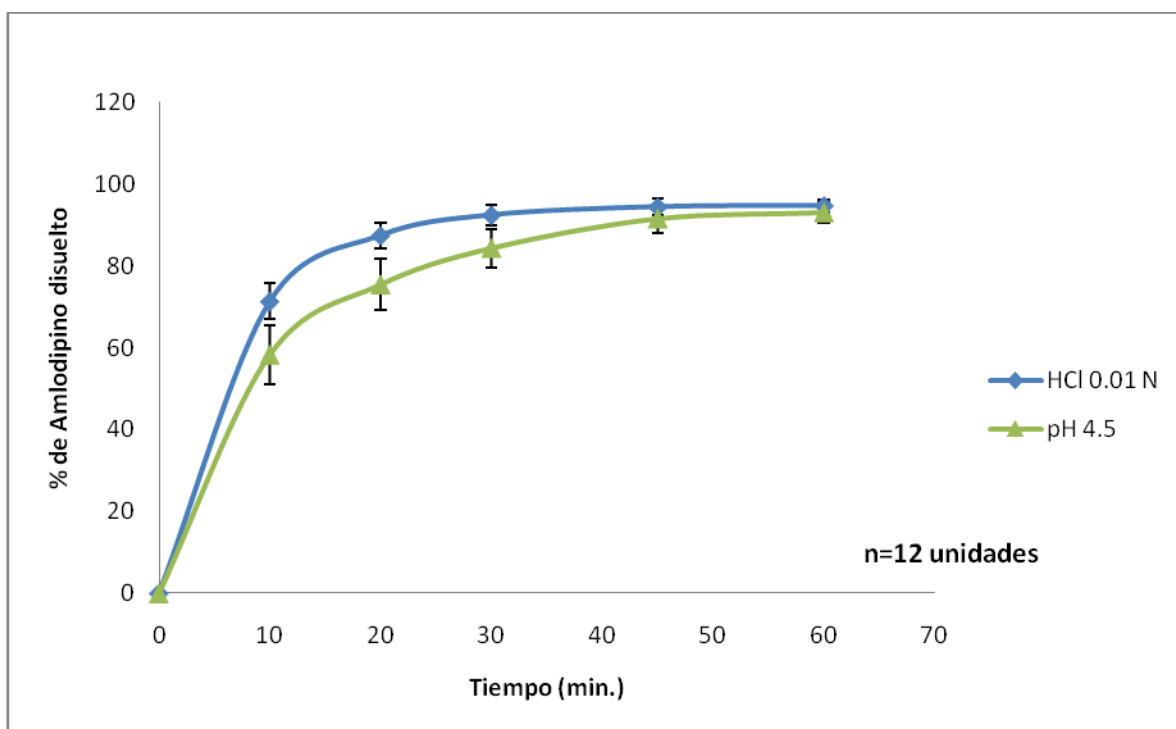


Figura 2 Perfiles de disolución de tabletas de Amlodipino lote AMDO1 a una velocidad de agitación de 50 rpm en dos medios de disolución.

| Medio de disolución | % Eficiencia de disolución a 60 minutos. |
|----------------------------|--|
| HCl 0,01 N | 81.1 |
| Solución reguladora pH 4,5 | 74.3 |

Tabla 7 Eficiencia de disolución obtenida en dos medios de disolución a una velocidad de agitación de 50 rpm.

7.4.-Perfiles de disolución en HCl 0,01 N a dos velocidades de agitación (50 y 75 rpm.) Con base a la eficiencia de disolución y a que el % CV es menor en todos puntos de muestreo en comparación a la solución reguladora pH 4.5, se realizó una comparación de los perfiles de disolución en HCl 0,01 N a una velocidad de agitación de 50 y 75 rpm. Observándose que a 75 rpm se obtuvo una mejor eficiencia de disolución pero la caracterización del perfil no es la deseada ya que la fase ascendente no está bien descrita debido a que las condiciones de prueba hacen que el principio activo presente una disolución rápida pudiéndose solamente caracterizar la fase de meseta la cual no es útil para una comparación entre dos productos., mientras que a 50 rpm se logra caracterizar mejor la fase ascendente no obstante a que la eficiencia de disolución es menor y el principio activo presenta una disolución más lenta.

| Medio de disolución | Velocidad de Agitación | TIEMPOS DE MUESTREO EN MINUTOS | | | | |
|---------------------|------------------------|--------------------------------|------|------|------|-------|
| | | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 |
| HCl 0,01 N | 50 rpm | 71.3 | 87.4 | 92.4 | 94.4 | 94.7 |
| HCl 0,01 N | 75 rpm | 91.3 | 98.0 | 99.3 | 99.0 | 100.1 |

Tabla 8 Valores promedio del % disuelto a los diferentes tiempos de muestreo en HCl 0,01 N a dos velocidades de agitación.

| Medio de disolución | Tiempos de Muestra (min.) | | | | | %C.V Promedio |
|---------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|---------------|
| | 10 | 20 | 30 | 45 | 60 | |
| HCl 0,01 N a 50 rpm | 4.4 | 3.2 | 2.5 | 2.0 | 1.6 | 2.7 |
| HCl 0,01 N a 75 rpm | 3.6 | 3.4 | 2.8 | 2.9 | 2.5 | 3.0 |

Tabla 9 Valores promedio del % disuelto a los diferentes tiempos de muestreo en HCl 0,01 N a dos velocidades de agitación.

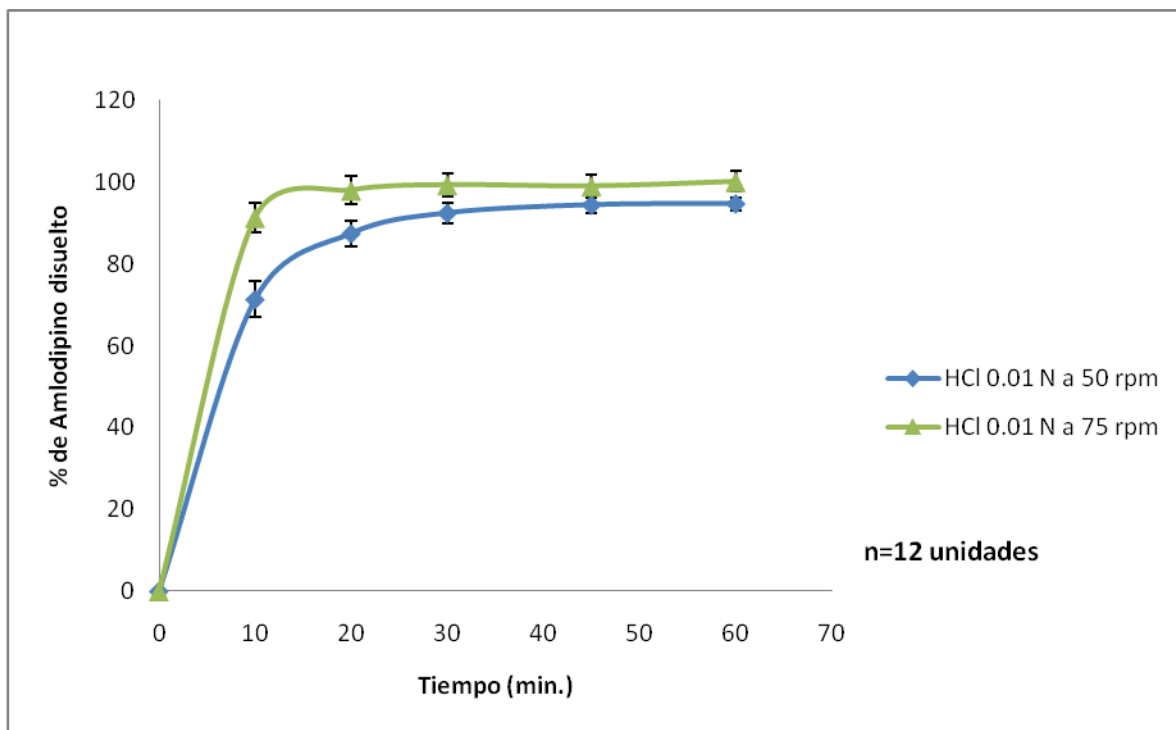


Figura 3 Perfiles de disolución de tabletas de Amlodipino lote AMDO1 a dos velocidades de agitación en HCl 0,01 N como medio de disolución.

| Medio de disolución | Velocidad de Agitación. | % Eficiencia de disolución a 60 minutos. |
|---------------------|-------------------------|--|
| HCl 0,01 N | 50 rpm | 81.1 |
| HCl 0,01 N | 75 rpm | 90.2 |

Tabla 10 Eficiencia de disolución obtenida en HCl 0,01 N a dos velocidades de agitación.

7.5.-Perfil de disolución en HCl 0,01 N a 50rpm con tiempos de muestreo de 5, 10, 15, 30 y 45 min. En la última modificación que se hizo al método de perfil de disolución se hicieron muestreos a 5, 10, 15, 30 y 45 minutos con lo cual se obtiene valores de % disuelto menores y se caracteriza la fase ascendente del perfil de disolución. Además los %CV para cada uno de los tiempos de muestreo se encuentran dentro de las especificaciones de la FDA garantizando una repetibilidad del método bajo las condiciones empleadas.

| Medicamento | Velocidad de Agitación | TIEMPOS DE MUESTREO EN MINUTOS | | | | |
|-------------|------------------------|--------------------------------|------|------|------|------|
| | | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 |
| Prueba | 50 rpm | 56.1 | 71.6 | 80.8 | 92.4 | 94.5 |

Tabla 11 Valores promedio del % disuelto a los diferentes tiempos de muestreo en HCl 0,01 N.

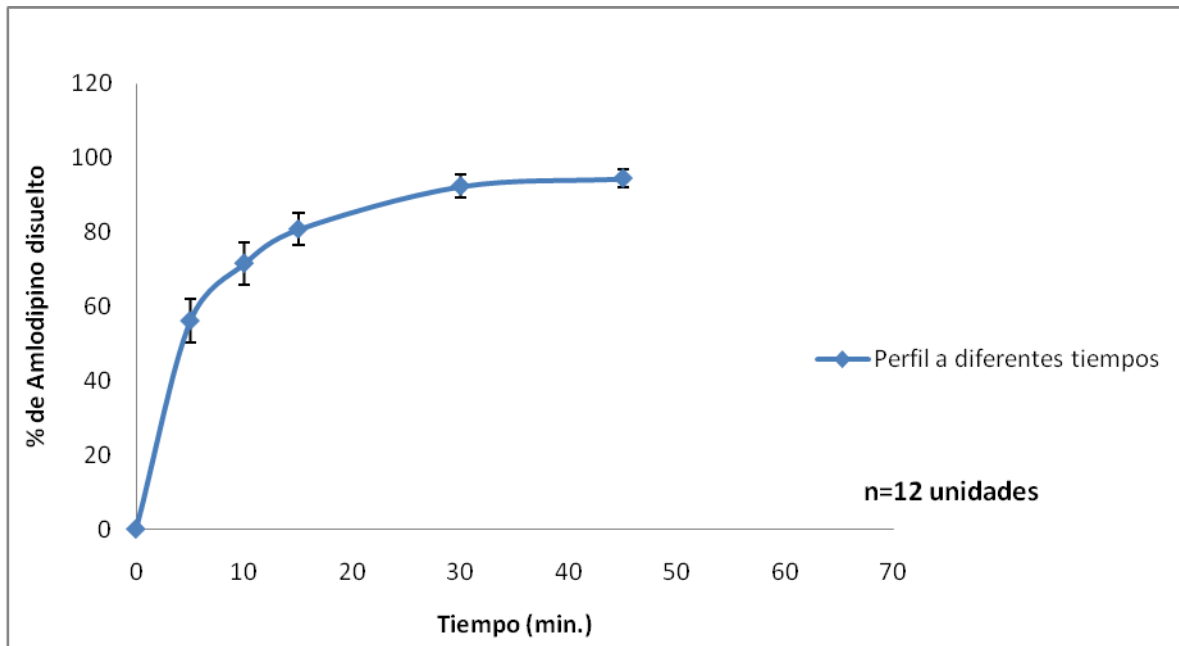


Figura 4 Perfil de disolución de tabletas de Amlodipino de prueba obtenidas en HCl 0,01 N a una velocidad de agitación de 50 rpm cambiando los tiempos de muestreo.

| Medicamento | Lote | % Eficiencia de disolución a 45 minutos. |
|-------------|-------|--|
| Prueba | AMD01 | 78.7 |

Tabla 12 Eficiencia de disolución del medicamento de prueba y en HCl 0,01 N a 50rpm.

| Medicamento. | Tiempos de Muestra (min.) | | | | |
|--------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|
| | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 |
| Prueba. | 5.8 | 5.7 | 4.4 | 3.1 | 2.4 |

Tabla 13 Valores de %CV del porcentaje disuelto en los diferentes tiempos de muestreo con una agitación de 50 rpm

Validación del Método Analítico para tabletas de Amlodipino de liberación inmediata

Linealidad del Sistema. En cuanto a la validación del sistema se observa que el método es lineal ya que se tiene un coeficiente de regresión (r^2) de 0.999, $m=3782.4$, $b=-369.7$ y se obtuvo un coeficiente de variación menor al 2% en los cinco niveles empleados en la linealidad y en el análisis por sextuplicado de una muestra de Amlodipino al 100 % asegurando que el sistema es preciso.

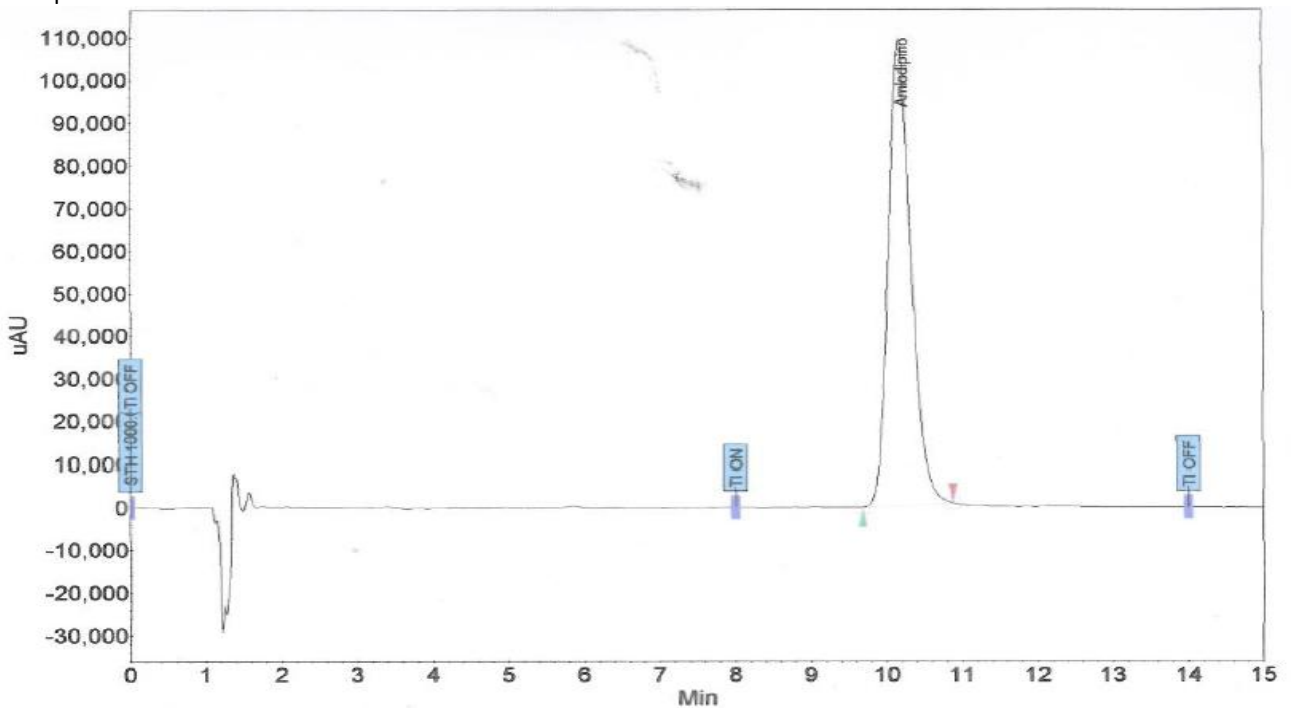


Figura 5 Cromatograma tipo de Amlodipino

En la Tabla 14y Figura 6 se presenta los resultados de la linealidad del sistema realizado en HCl 0,01 N

| Concentración µg/mL | Respuesta Analítica. | | | Promedio | Desviación Estándar | %Coeficiente de variación |
|------------------------|----------------------|---------|---------|----------|------------------------|------------------------------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | | | |
| 4 | 14935.2 | 14989.5 | 14808.3 | 14911.0 | 92.992 | 0.624 |
| 6 | 22322.6 | 22133.6 | 22260.7 | 22239.0 | 96.356 | 0.433 |
| 8 | 29755.8 | 29723.7 | 29247.1 | 29575.5 | 284.88 | 0.963 |
| 10 | 37423.1 | 38215.3 | 37570.4 | 37736.3 | 421.34 | 1.117 |
| 12 | 45060.2 | 44595.2 | 45304.5 | 44986.6 | 360.32 | 0.801 |

Tabla 14 Resultados de la linealidad del Sistema.

Linealidad del Sistema.

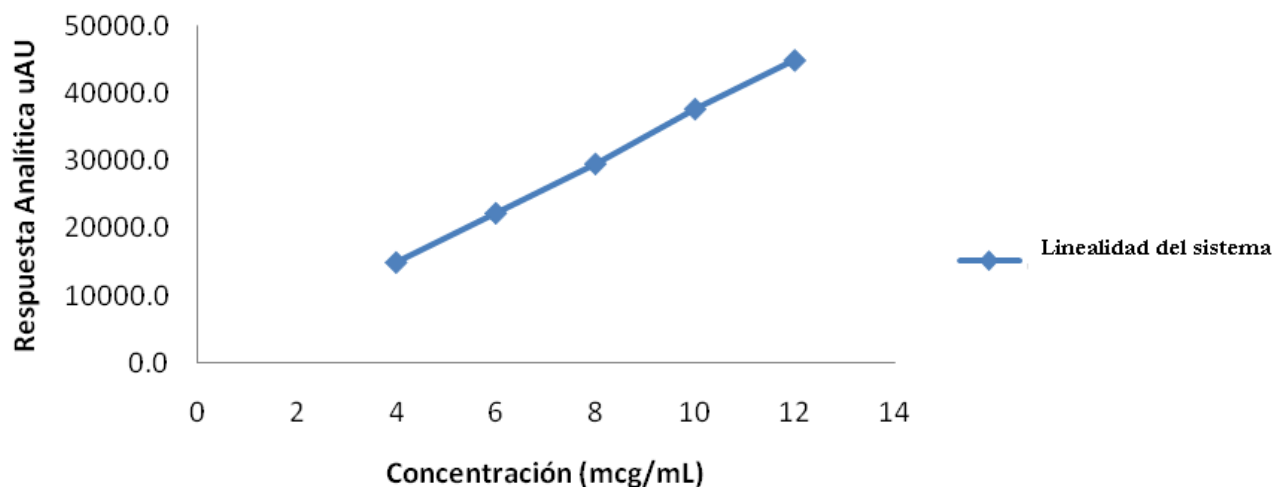


Figura 6 Resultados de la linealidad del sistema.

| Parámetros Estadísticos de la regresión. | Valor Obtenido | Criterio de Aceptación |
|--|----------------|------------------------|
| Pendiente | 3782.4 | |
| Intercepto | -369.7 | |
| Coficiente de Regresión | 0.999 | $r^2 \geq 0.99$ |
| Error relativo | 0.6 | <2 |

Tabla 15 Resultados estadísticos de la linealidad del Sistema.

Precisión del Sistema.

En la Tabla 16 se presentan los resultados de la precisión del sistema realizado en HCl 0,01 N

| Concentración $\mu\text{g/mL}$. | Respuesta Analítica uAU | | | Promedio | Desviación Estándar. | %CV |
|----------------------------------|-------------------------|---------|---------|----------|----------------------|-------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | | | |
| 10 | 37866.2 | 37641.3 | 37647.8 | 37686.7 | 236.9 | 0.629 |
| | 37878.7 | 37584.9 | 37425.1 | | | |
| | 38012.7 | 37629.8 | 37578.8 | | | |
| | 37994.6 | 37688.2 | 37281.7 | | | |
| | 38113.0 | 37607.6 | 37691.3 | | | |
| | 37922.5 | 37477.8 | 37318.4 | | | |

Tabla 16 Resultados de la Precisión del sistema

Validación del método Los parámetros evaluados en la validación del método para el producto de referencia y de prueba fueron, linealidad, precisión y exactitud en los que se obtuvieron resultados satisfactorios ya que en la linealidad la r^2 para el

método para el medicamento de referencia y de prueba son 0.997 y 0.999 respectivamente, con una $b=-0.116$, m de 1.009 para el producto de prueba y una $b=-0.064$, $m = 0.998$ para el producto de referencia.

En la precisión del método se obtuvo un %CV global de 0.710% para el producto de prueba y 1.003 para el producto de referencia, cumpliéndose con el criterio de aceptación el cual es un % CV<2. Con los mismos datos generados de la linealidad se calculó el % de recobro de Amlodipino para el producto de referencia y el producto de prueba obteniéndose resultados entre el rango de (97.0-103 %) por nivel.

| Concentración $\mu\text{g/mL}$. | Respuesta Analítica (uAU) | Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$.) | % de Recobro | Promedio del % de Recobro | Desviación Estándar | % CV |
|----------------------------------|---------------------------|---|--------------|---------------------------|---------------------|-------|
| 4 | 14854.7 | 4.03 | 100.6 | 100.63 | 1.25 | 1.237 |
| | 15044.6 | 4.08 | 101.9 | | | |
| | 14667.8 | 3.98 | 99.4 | | | |
| 6 | 22006.5 | 5.92 | 98.6 | 99.28 | 0.88 | 0.884 |
| | 22089.9 | 5.94 | 99.0 | | | |
| | 22385.4 | 6.02 | 100.3 | | | |
| 8 | 29896.6 | 8.00 | 100.0 | 99.11 | 0.97 | 0.977 |
| | 29652.1 | 7.94 | 99.2 | | | |
| | 29313.3 | 7.85 | 98.1 | | | |
| 10 | 37114.1 | 9.91 | 99.1 | 99.90 | 0.81 | 0.808 |
| | 37724.7 | 10.07 | 100.7 | | | |
| | 37408.6 | 9.99 | 99.9 | | | |
| 12 | 45339.4 | 12.08 | 100.7 | 99.98 | 1.11 | 1.109 |
| | 44429.7 | 11.84 | 98.7 | | | |
| | 45258.1 | 12.06 | 100.5 | | | |

Tabla 17 Resultados de la linealidad del Método del medicamento de referencia (Norvas).

| Concentración $\mu\text{g/mL}$. | Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$.) | | | Promedio del % de Recobro | Desviación Estándar | %C.V del % de Recobro. |
|----------------------------------|---|---------|---------|---------------------------|---------------------|------------------------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | | | |
| 4 | 4.03 | 4.08 | 3.98 | 100.6 | 1.25 | 1.237 |
| 6 | 5.92 | 5.94 | 6.02 | 99.3 | 0.88 | 0.884 |
| 8 | 8.00 | 7.94 | 7.85 | 99.1 | 0.97 | 0.977 |
| 10 | 9.91 | 10.07 | 9.99 | 99.9 | 0.81 | 0.808 |
| 12 | 12.08 | 11.84 | 12.06 | 99.9 | 1.11 | 1.109 |

Tabla 18 Resultados de la precisión del Método del medicamento de referencia (Norvas).

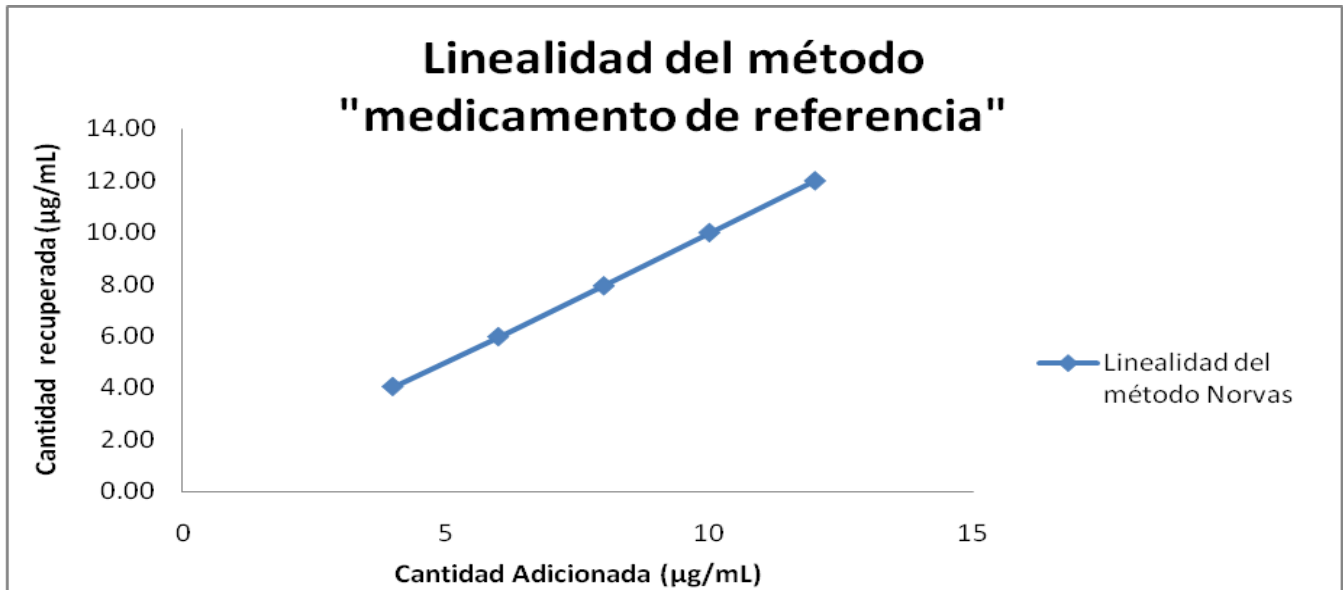


Figura 7 Grafica de la linealidad del método del medicamento de referencia.

| Parámetros Estadísticos de la regresión. | Valor Obtenido | Criterio de Aceptación |
|--|----------------|------------------------|
| Pendiente | 0.998 | |
| Intercepto | -0.064 | |
| Coefficiente de Regresión | 0.997 | $r^2 \geq 0.99$ |
| Error relativo | 1.3 | <2 |

Tabla 19 Resultados estadísticos de la linealidad el método (Medicamento de referencia)

| Concentración $\mu\text{g/mL}$. | Respuesta Analítica (uAU) | Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$.) | % de Recobro | Promedio del % de Recobro | Desviación Estándar | % CV |
|----------------------------------|---------------------------|---|--------------|---------------------------|---------------------|-------|
| 4 | 14739.7 | 3.99 | 99.87 | 99.32 | 1.90 | 1.912 |
| | 14892.9 | 4.04 | 100.88 | | | |
| | 14336.7 | 3.89 | 97.20 | | | |
| 6 | 22050.1 | 5.93 | 98.79 | 99.26 | 0.69 | 0.700 |
| | 22082.3 | 5.94 | 98.93 | | | |
| | 22337.9 | 6.00 | 100.06 | | | |
| 8 | 29178.5 | 7.81 | 97.65 | 97.98 | 0.29 | 0.296 |
| | 29345.8 | 7.86 | 98.20 | | | |
| | 29307.3 | 7.85 | 98.08 | | | |
| 10 | 37142.5 | 9.92 | 99.18 | 99.49 | 0.51 | 0.515 |
| | 37486.7 | 10.01 | 100.09 | | | |
| | 37159.6 | 9.92 | 99.22 | | | |
| 12 | 45334.9 | 12.08 | 100.70 | 100.56 | 0.13 | 0.128 |
| | 45219.1 | 12.05 | 100.44 | | | |
| | 45266.0 | 12.07 | 100.54 | | | |

Tabla 20 Resultados de la linealidad del método del medicamento de prueba.

| Concentración $\mu\text{g/mL}$. | Cantidad Recuperada ($\mu\text{g/mL}$.) | | | Promedio del % de Recobro | Desviación Estándar | %C.V del % de Recobro. |
|----------------------------------|---|---------|---------|---------------------------|---------------------|------------------------|
| | Curva 1 | Curva 2 | Curva 3 | | | |
| 4 | 99.87 | 100.88 | 97.20 | 99.32 | 1.90 | 1.912 |
| 6 | 98.79 | 98.93 | 100.06 | 99.26 | 0.69 | 0.700 |
| 8 | 97.65 | 98.20 | 98.08 | 97.98 | 0.29 | 0.296 |
| 10 | 99.18 | 100.09 | 99.22 | 99.49 | 0.51 | 0.515 |
| 12 | 100.70 | 100.44 | 100.54 | 100.56 | 0.13 | 0.128 |

Tabla 21 Resultados de la precisión y exactitud del Método del medicamento de prueba.

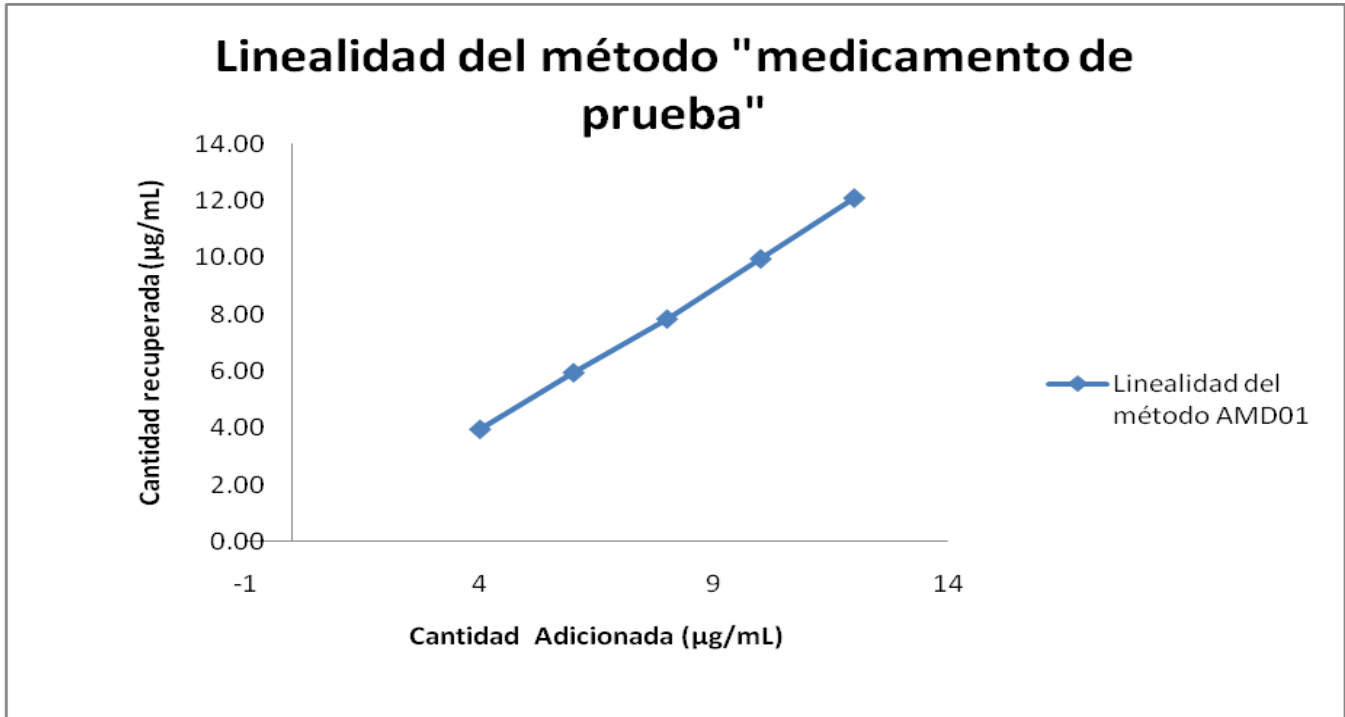


Figura 8 Grafica de la linealidad del método (medicamento de prueba)

| Parámetros Estadísticos de la regresión. | Valor Obtenido | Criterio de Aceptación |
|--|----------------|------------------------|
| Pendiente | 1.009 | |
| Intercepto | -0.116 | |
| Coefficiente de Regresión | 0.999 | $r^2 \geq 0.99$ |
| Error relativo | 0.7 | <2 |

Tabla 22 Resultados estadísticos de la linealidad del método (medicamento de prueba)

Precisión Intermedia. Mientras que para la precisión intermedia se evaluó el efecto del día en el análisis ya que los perfiles fueron realizados por un solo analista y con un solo equipo de disolución y cromatografía, obteniéndose un %CV de 0.85 para el producto de referencia y 0.34 para el producto de prueba, al realizar el análisis de variancia se determino que los análisis realizados al medicamento de prueba y el de referencia en diferentes días no son diferentes ya que la F calculada es menor que F teórica se acepta la Ho, por lo que el análisis realizado en diferentes días no es significativamente diferente. Ver de la Tabla 23 a la Tabla 25.

| Producto | Área (mAu) Día 1 | | | Área (mAu) Día 2 | | | Promedio | %CV |
|------------|------------------|---------|---------|------------------|---------|---------|----------|-------|
| Prueba | 37159.6 | 37142.5 | 37486.7 | 37116.9 | 37440.3 | 37922.5 | 37378.1 | 0.831 |
| Referencia | 37408.6 | 37724.7 | 37114.1 | 37905.2 | 37793.3 | 37953.7 | 37649.9 | 0.863 |

Tabla 23 Resultados de la precisión intermedia

| Fuente de Variación | g.l. | SC | C.M | F calculada | F teórica |
|---------------------|------|----------|---------|-------------|-----------|
| Tratamiento=día | 1 | 3577.0 | 3577.0 | 0.11 | 7.71 |
| Error | 4 | 134147.4 | 33536.9 | | |
| Total | 2 | 137724.5 | | | |

Tabla 24 Análisis de variancia para el análisis de muestras del medicamento de prueba en un perfil de disolución en diferentes días.

| Fuente de Variación | g.l. | SC | C.M | F calculada | F teórica |
|---------------------|------|------------|----------|-------------|-----------|
| Tratamiento=día | 1 | 328629.6 | 328629.6 | 6.57 | 7.71 |
| Error | 4 | 199944.6 | 49986.2 | | |
| Total | 2 | -162843156 | | | |

Tabla 25 Análisis de variancia para el análisis de muestras del medicamento de referencia en un perfil de disolución en diferentes días.

Evaluación de Filtro. Como parte fundamental de la validación se evaluó la influencia del filtro para el producto de prueba y de referencia ya que se tienen diferentes excipientes los cuales pueden tener una retención diferente, se obtuvieron %CV de 0,869 y 1,750 para el producto de prueba y de referencia respectivamente. Ver Tabla 26 y Tabla 27.

| Condición | Respuesta Analítica Área (mAu) | | | | | | Promedio | Desviación Estándar | %CV |
|-------------|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------------------|-------|
| Sin Filtrar | 35527,9 | 34264,7 | 34743,8 | 34579,0 | 34700,7 | 34603,7 | 34767,4 | 302,19 | 0,869 |
| Filtrada | 34928,2 | 34974,9 | 34606,3 | 34730,9 | 34669,6 | 34848,2 | | | |

Tabla 26 Resultados de la evaluación del filtro para el producto de prueba.

| Condición | Respuesta Analítica Área (mAu) | | | | | | Promedio | Desviación Estándar | %CV |
|-------------|--------------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|---------------------|-------|
| Sin Filtrar | 35522,5 | 35422,9 | 35773,9 | 33613,6 | 35253,4 | 35194,1 | 35411,31 | 619,67 | 1,750 |
| Filtrada | 36007,7 | 35768,7 | 35417,3 | 35580,1 | 35949,0 | 35733,3 | | | |

Tabla 27 Resultados de la evaluación del filtro para el producto de referencia.

Estabilidad de la muestra. También se evaluó la estabilidad de una solución estándar de Amlodipino obteniéndose un %CV de 1.725 entre las inyecciones de la solución inmediatamente después de su preparación y 24 horas después de su preparación y en almacenamiento en viales ámbar, con una solución con la misma concentración y analizada bajo las mismas condiciones solamente cambiando el almacenamiento en viales transparentes se obtuvo un %CV de 1.395 por lo cual se cumple con el criterio de aceptación de un %CV<2. Ver Tabla 28 a la Tabla 30.

| Tiempo(horas) | Concentración (µg/mL.) | Respuesta Analítica(mAu) | | | | | | Promedio | %CV |
|---------------|------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|-------|
| | | | | | | | | | |
| Inicial | 10 | 37637.3 | 37741.6 | 37742.5 | 37909.8 | 37558.5 | 37294.3 | 37602.3 | 0,635 |
| 24 | 10 | 36641.0 | 36773.1 | 36919.1 | 36862.2 | 36943.2 | 36788.3 | 36821.1 | 0,302 |

Tabla 28 Resultados de la estabilidad de la solución estándar de Amlodipino.

| Tiempo (horas) | Concentración (µg/mL.) | Respuesta Analítica(mAu) | | | Promedio | %CV |
|----------------|------------------------|--------------------------|---------|---------|----------|-------|
| | | Vial Ámbar | | | | |
| Inicial | 10 | 37548,6 | 37445,1 | 37386,9 | 36922,6 | 1,725 |
| 24 | 10 | 36819,0 | 36152,8 | 36183,6 | | |

Tabla 29 Resultados de la estabilidad en viales ámbar

| Tiempo (horas) | Concentración (µg/mL.) | Respuesta Analítica(mAu) | | | Promedio | %CV |
|----------------|------------------------|--------------------------|---------|---------|----------|-------|
| | | Vial transparente | | | | |
| Inicial | 10 | 37388,8 | 36909,0 | 36840,2 | 36778,0 | 1,395 |
| 24 | 10 | 36372,2 | 37161,7 | 35996,3 | | |

Tabla 30 Resultados de la estabilidad en viales transparentes.

Robustez del método. Como último parámetro de la validación se evaluó la robustez del método cuando se presenta un cambio en el pH de la fase móvil en cual debe ser 3.0, haciendo una variación de 0.5 unidades de pH menos se obtiene un %CV de 1.203 cumpliendo con el criterio de aceptación de $CV < 2\%$, pero cuando se hizo una variación de 1 unidad de pH hacia arriba se obtuvo un CV de 2.07% por lo cual no se cumple con el criterio de aceptación.

En la Tabla 31 se presentan los resultados de la robustez del método analítico con variaciones de pH en la fase móvil.

| pH | Respuesta Analítica(mAu) | Promedio | %CV |
|-----|--------------------------|----------|-------|
| 2.5 | 37416,5 | 36738,5 | 1,203 |
| | 36475,5 | | |
| | 36347,8 | | |
| 3.0 | 36355,7 | | |
| | 36711,1 | | |
| | 37124,1 | | |

Tabla 31 Resultados de la robustez del método analítico con variaciones de pH en la fase móvil.

En la Tabla 32 se presentan los resultados de la robustez del método analítico con variaciones de pH en la fase móvil.

| pH | Respuesta Analítica(mAu) | Promedio | %CV |
|-----|--------------------------|----------|------|
| 3.0 | 36355,7 | 37354,9 | 2,07 |
| | 36711,1 | | |
| | 37124,1 | | |
| 4.0 | 37736,9 | | |
| | 38091,1 | | |
| | 38062,0 | | |

Tabla 32 Resultados de la robustez del método analítico con variaciones de pH en la fase móvil.

Comparación del perfil de disolución del medicamento de referencia y del medicamento de prueba. Los resultados obtenidos mediante las condiciones para el perfil de disolución y el método analítico validado para el medicamento de referencia y de prueba son buenos ya que los %CV del % disuelto en todos los puntos de muestreo cumple con el criterio de aceptación de CV<20 en el primer punto de muestreo y CV<10 en los demás puntos de muestreo, además se caracteriza el perfil de disolución de los dos medicamentos. En cuanto a la eficiencia de disolución se nota que la del producto de referencia es menor a la del producto de prueba por lo cual se obtuvo una f_2 70.2 el cual es un valor muy bajo a pesar de que se encuentra dentro del rango de 50-100.

| Medicamento | Lote | Tiempo de muestreo en minutos. | | | | |
|-------------|------------|--------------------------------|------|------|------|------|
| | | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 |
| Referencia. | 7180530001 | 53.7 | 66.9 | 76.0 | 87.9 | 93.1 |
| Prueba | AMD01 | 56.1 | 71.6 | 80.8 | 92.4 | 94.5 |

Tabla 33 Valores promedio del % disuelto del medicamento de referencia y de prueba.

| Medicamento. | Tiempos de Muestra (min.) | | | | | %C.V Promedio |
|------------------------|---------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------|
| | 5 | 10 | 15 | 30 | 45 | |
| Referencia. | 4.3 | 3.5 | 3.8 | 3.2 | 2.2 | 2.8 |
| Prueba | 7.9 | 7.3 | 6.6 | 3.9 | 2.6 | 5.7 |
| Criterio de Aceptación | 20 | 10 | 10 | 10 | 10 | Sin Especificación |

Tabla 34 Valores del % CV del por ciento disuelto en el perfil de disolución del medicamento referencia y del medicamento de prueba.

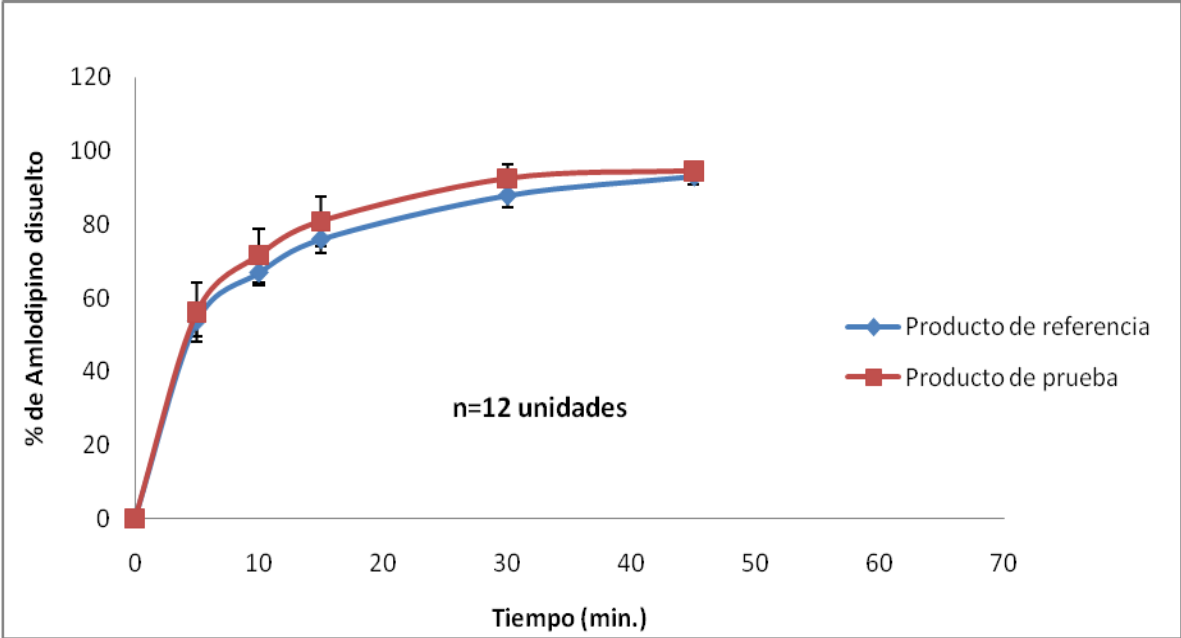


Figura 9 Perfiles de disolución del medicamento de prueba y del medicamento de referencia

| Rt-Pt | (Rt-Pt)² |
|--------------|----------------------------|
| -2.45 | 5.996 |
| -4.65 | 21.662 |
| -4.83 | 23.329 |
| -4.50 | 20.250 |
| -1.37 | 1.874 |
| Σ | 73.1 |
| (Σ)*0.2 | 14.62 |
| [(Σ)*0.2]+1 | 15.62 |

$$F2 = 50 * (\log (100/\sqrt{15.62}))$$

| Medicamento | f ₂ | % Eficiencia de disolución a 45 minutos. |
|-------------|----------------|--|
| Referencia | | 75.1% |
| Prueba | 70.2 | 78.1% |

Tabla 35 Eficiencia de disolución y cálculo de f₂ del medicamento de referencia y del medicamento prueba bajo las condiciones seleccionadas

8. Conclusiones

Con base a los perfiles de disolución realizados bajo diferentes medios de pH, diferentes velocidades de agitación y tiempos de muestreo se concluye que el HCl 0,01 N es el mejor medio de disolución para realizar los perfiles de disolución ya que este es el más biorelevante ya que el Amlodipino se absorbe a nivel de estómago el cual presenta un pH ácido, además de que en este medio de disolución se obtiene una buena eficiencia de disolución. Mientras que la velocidad a la cual se logra caracterizar el perfil de disolución son 50 rpm con muestreos a 5, 10, 20, 30 y 45 minutos siendo estas condiciones óptimas para lograr un método reproducible y capaz de diferenciar entre dos formulaciones.

En la validación del sistema se determinó que este es lineal y preciso ya que se obtiene una respuesta analítica proporcional a las concentraciones, y con un %CV menor al 2%. También se concluye que el método analítico para el producto de referencia y de prueba es lineal, preciso y exacto ya que la cantidad recuperada es proporcional a la cantidad adicionada en los diferentes niveles de trabajo, siendo el % CV global menor al 2% en cada uno de los niveles evaluados y se obtuvo un porcentaje de recobro en todos los niveles dentro del rango de 97.0-103% por lo que se cumple con los criterios de aceptación establecidos. Además el método presenta precisión intermedia ya que cumple con el criterio de aceptación fijado. Por lo que se concluye que la metodología analítica cumple con el propósito para el cual fue diseñada.

Por otro lado se concluye que los filtros empleados en el perfil de disolución no interfieren de manera significativa con la cuantificación del principio activo ya que las muestras filtradas y no filtradas presentan un % CV menor 2.

También se determinó que en la validación del método analítico que las soluciones de Amlodipino son estables a una temperatura de 10°C en un intervalo de 24 horas después de su preparación ya que la respuesta analítica no varía en más de un 2%. Y el método es robusto con una variación de 0.5 unidades de pH pero no bajo variaciones de 1 unidad de pH en la fase móvil por lo cual debe cuidarse el pH de la fase móvil para no causar un error en la cuantificación de Amlodipino y de preferencia trabajar con soluciones que no excedan las 24 horas de preparación.

Con base a los % disueltos del medicamento de prueba y de referencia obtenidos mediante las condiciones establecidas para realizar un perfil de disolución de Amlodipino y cuantificadas mediante un método analítico validado se concluye que el medicamento de prueba presenta un perfil de disolución similar al medicamento de referencia por lo cual también se concluye que el método analítico diseñado es capaz de discriminarlas entre dos formulaciones diferentes.

9. Propuesta y/o recomendaciones.

En caso de transferencia del método analítico se recomienda evaluar la precisión intermedia incluyendo las variables de analista y equipos (HPLC y disolutor los cuales pueden ser de diferentes marcas o de diferentes modelos.)

La forma del perfil de disolución con respecto al medicamento de referencia es parecida pero lo que afecta el factor de similitud es que el medicamento de prueba libera más rápidamente el principio activo por lo cual se propone realizar una nueva formulación en la cual se modifiquen los porcentajes de (desintegrante y aglutinante.)

1. Bibliografía.

1. De León R. "Evaluación del perfil de disolución de distintas formas farmacéuticas utilizando diferentes métodos de muestreo" Tesis de Licenciatura, UNAM, México 1999.
2. Cárdenas H., Cortés A., Aspectos biofarmacéuticos de la evaluación de medicamentos. Universidad Autónoma Metropolitana. México 1996.
3. Comisión Federal para la Protección contra riesgos sanitarios. (Febrero 2007). [www] URL: <http://www.cofepris.gob.mx>
4. NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
5. U.S. Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia 30/National Formulary 25. Rockville, MD: USP.
6. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Dissolution Testing of Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Development, Evaluation and Application of In Vitro/In Vivo Correlations. FDA, Rockville, MD. August 1997.
7. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, Release Solid Oral Dosage Forms. Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In Vitro Dissolution Testing, and In Vivo Bioequivalence Documentation [SUPAC-IR], November 1995.
8. Lewis, J. Leeson, Pb O. ANDA Dissolution Method Development and Validation. Dissolution Technologics. Volume 4, Issue 1: Feb 1997
9. Ragno G. Design and monitoring of photostability system for amlodipine dosage forms. International Journal of Pharmaceutics 2003 (265):125-132)
10. Martin, GP. Reed, DG. Magiso, LE. Griffith, MF. Ip, D, Tutorial on Dissolution Calibration: An Industrial Perspective. Dissolution Technologics. Volume 3, Issue 1: Feb 1996
11. Park S-H. Choi H-K. The effects of surfactants on the dissolution profiles of poorly water-soluble acidic drugs. International Journal of Pharmaceutics 2006 (321): 35-41.
12. El-Massik M. Darwish I. Hassan E. El-Khordagui L. Development of a dissolution medium for glibenclamide. International Journal of Pharmaceutics. 1996 (140): 69-76.
13. Rohrs, B. Dissolution Method Development for Poorly Soluble Compounds. Dissolution Technologics. Volume 8, Issue 3, Aug 2001
14. FEUM. 8ª. ed Secretaria de Salud. Vol. I. México 2004.
15. British Pharmacopeia, British Pharmacopeia Commission 2007.
16. PROY-NOM-059-SSA1-2004, Buenas prácticas de fabricación para establecimientos de la industria química farmacéutica dedicados a la fabricación de medicamentos.
17. The International Pharmacopeia, World Health Organization (<http://www.who.int/medicines/publications/pharmacopoeia/en/index.html>)
18. Food and drug administration (<http://www.fda.gov>)
19. Siewert, M. Dressman, J. Brown, C. Shah, V. FIP/AAPS Guidelines to Dissolution/in Vitro Release Testing of Novel/Special Dosage Forms*. *AAPS PharmSciTech* 2003; 4 (1) Article 7 (<http://www.pharmscitech.org>).
20. Ma M., Lin R., Liu J., Statistical Evaluations of Dissolution Similarity. *Statistica Sinica*. (1999) 9: 1011-1027.
21. Tsong Y., Hammerstrom T., Sathe P., Shah V. Statistical Assessment of mean differences between two dissolution data sets. *Drug Information Journal*, (1996) Vol. 30: 1105-1112.
22. Shah V., Ph D. Dissolution: A Quality Control Test vs. A Bioequivalence Test. Dissolution Technologics. Volume 8, Issue 4, Nov 2001
23. ICH Harmonized Tripartite Guideline Validation of analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)
24. Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. CDER. November 1994
25. Rubinson K., Rubinson J., Análisis instrumental. Pearson Educación, S.A. España 2001. pag: 114-119
26. Guía de Validación de Métodos analíticos CNQFB editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, AC. Versión 2002.
27. Skoog D., Holler J., Nieman T., Principios de análisis instrumental. 5ª Edición. McGraw-Hill México 2001 pag :11-18
28. Aguirre L., Martín M., Validación de métodos analíticos. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. España 2001.

29. Abdoh A., Al-Omari M., Badwan A., Jaber A. Amlodipine Besylate–Excipients Interaction in Solid Dosage Form
30. Jin Jang D., Ju Jeong E., Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006 (28) :205-213
31. Mohammadi A., A stability-indicating high performance liquid chromatographic (HPLC) assay for the simultaneous determination of atorvastatin and amlodipine in commercial tablets. *Journal of Chromatographic B* 2007 (846):251-221
32. Flores J. Armijo J. Mediavilla A. *Farmacología Humana*. 4ª Edición. México: Editorial Masson, 2003: 675-673.
33. Heady T., Gomora J., Macdonald T., Perez E., Molecular Pharmacology of T-type Ca²⁺ Channels. *Japanese Journal of Pharmacology*. (2001) 85: 339-350
34. Secretaría de Salud. Relación de especialidades farmacéuticas susceptibles de incorporarse al catálogo de medicamentos genéricos intercambiables, se determinan las pruebas que deberán aplicárseles y señala el producto innovador o de referencia designado. (Marzo 2007)

1. Anexos

1.1. Formulas de Cálculos

Desviación Estándar de la muestra.

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2},$$

Desviación Estándar Relativa.

$$DER = (S / \text{Promedio de la muestra}) \times 100$$

Pendiente

$$m = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X^2) - (\sum X)^2}$$

Ordenada al origen

$$b = \frac{\sum Y - m(\sum X)}{n}$$

$$r^2 = \frac{n(\sum XY) - (\sum X)(\sum Y)}{n(\sum X - (\sum X)^2 / n)(\sum Y - (\sum Y)^2 / n)}$$

1.2. Checklist para realizar una prueba de perfil de disolución.

| Variable | Máximo Permitido | Exceso más común | Efecto del exceso |
|-------------------------|----------------------------|-----------------------|-------------------|
| Excentricidad | ± 2 mm | 2-5 mm | + 4-8% |
| Vibración | 0.1 mils | 0.2-0.9 mils | +5-10% |
| Alineación | 1.5° perpendicularmente | 2-7° | +2-25% |
| Velocidad de Agitación | $\pm 4\%$ | $\pm 10\%$ | Lineal. |
| Gas disuelto | medio desgasificado | formación de burbujas | + 50 % |
| Contaminación del medio | ppm | iones, surfactantes | substantial |
| Evaporación del medio | ninguno | 2-5% | lineal |
| Temperatura del medio | ± 0.5 | 1-2°C | lineal |