

**Tentamen FA-208, Formuleren en Bioequivalentie
cursusjaar 2008/2009, periode II**

datum: woensdag 28 januari 2009

tijd: 9-12 uur

locatie: Vechtse hal 3

- a) Dit tentamen bevat 5 vragen.
- b) Er zijn in totaal 100 punten te verdienen.
 - Vraag 1: 24 pt
 - Vraag 2: 20 pt
 - Vraag 3: 20 pt
 - Vraag 4: 18 pt
 - Vraag 5: 18 pt
- c) Vraag 5 telt mee voor het blok FA208 en telt ook mee voor "rekenvaardigheden".
- d) Grafische rekenmachines zijn toegestaan bij dit tentamen.
- e) **Beantwoord elke vraag op de daarvoor vrijgelaten ruimte bij de vraag.** Vervolg uw antwoord op de achterzijde van het vragenformulier als de ruimte niet toereikend is. Schrijf het antwoord niet op de achterzijde van andere vragen (i.v.m. het snel nakijken door diverse docenten).
- f) **Schrijf op ieder antwoordblad uw naam en studentnummer en tafelnummer.**
- g) Het tentamen is geniet; maak dit niet los (ivm wegraken van tentamenbladen). Lever alle antwoordbladen in.
- h) De uitslag van het tentamen wordt bekend gemaakt via studiezaken en op WebCT
- i) Inkijken van het tentamen is alleen mogelijk na het maken van een afspraak. (Zie het blokboek)
- j) Bijlagen:
 - I. Farmacokinetische formules.
 - II. Statistiek formules
 - III. Statistiek tabellen
 - IV. EP monografie 2.9.3.

VEEL SUCCES!

Vraag 1. (24 punten)

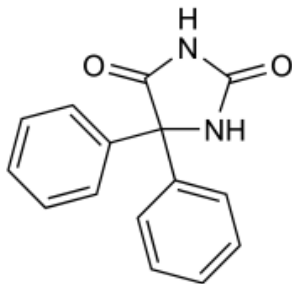
Vraag 1A. (6 punten)

Het Biochemical Classification System deelt stoffen in 4 klassen in, afhankelijk van hun mate van oplosbaarheid (hoog/laag) en permeabiliteit (hoog/laag)

	High solubility	Low solubility
High permeability	I	II
Low permeability	III	IV

Geef van elk van onderstaande stoffen aan tot welke klasse ze behoren; wat de limiterende factor is in hun orale biologische beschikbaarheid en hoe die verbeterd kan worden.

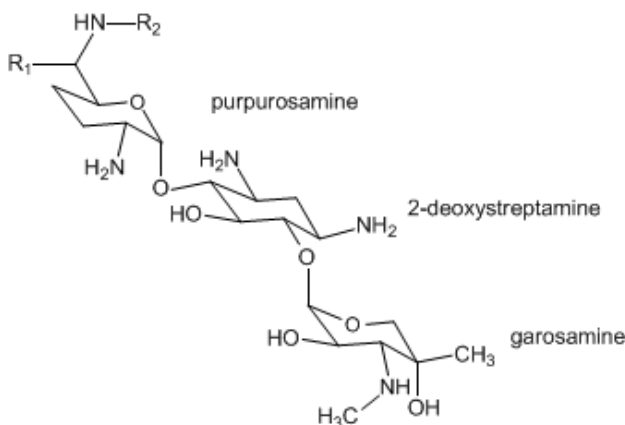
a) fenytoïne



pKa = 8,3; log P = 2,5

-
-
-

b) gentamicine

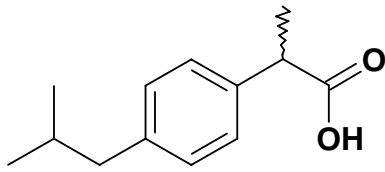


Gentamicin C₁ R₁ = R₂ = CH₃
 Gentamicin C₂ R₁ = CH₃, R₂ = H
 Gentamicin C_{1a} R₁ = R₂ = H

pKa = 8,9, log P = -1,9

-
-
-

c) ibuprofen



pKa 4.9 logP 3.5

Vraag 1B. (6 punten)

Naar welke farmacokinetische parameters wordt (door de registratie autoriteiten) gekeken bij het bio-equivalentie onderzoek?

Geef aan of er verschillen zijn tussen de EU en de USA richtlijnen.

Vraag 1C. (6 punten)

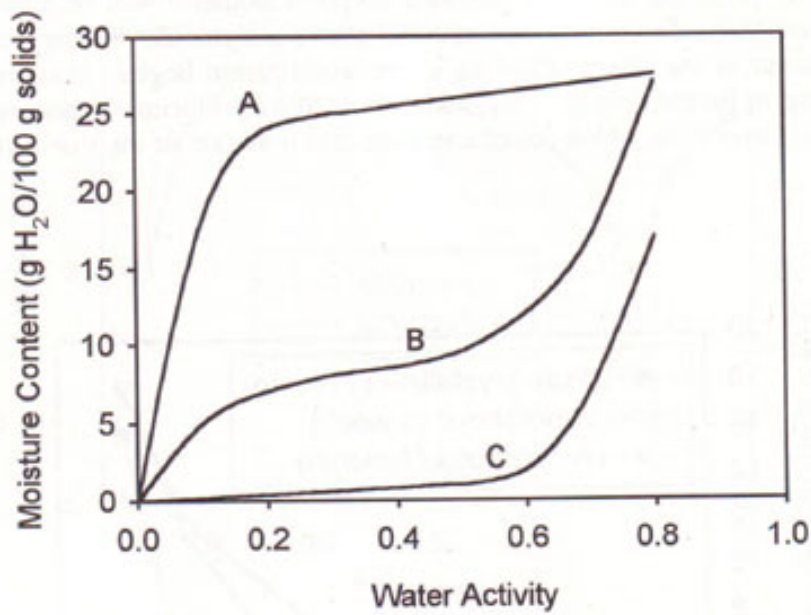
Vanwege het veelvuldig optreden van maagpijn bij het gebruik van ibuprofen is er een nieuwe formulering ontwikkeld voor Ibuprofen **bruistabletten**. Deze tabletten moeten voor inname in een groot glas water opgelost worden. De samenstelling is hieronder gegeven. Benoem de functie van de hulpstoffen (met een korte toelichting).

hulpstoffen ibuprofen bruistabletten:

- Microkristallijne cellulose
- Croscarmellose natrium
- Natrium saccharine
- Sucrose
- Povidon
- Natrium bicarbonaat
- Natrium carbonaat
- Sinaasappel essence
- Natrium laurylsulfaat
- Malinezuur

Vraag 1D. (6 punten)

Welke van de lijnen in de figuur geeft het beste de vochtisotherm weer van microkristallijne cellulose? Geef een korte beschrijving van het verloop van de isotherm en waarom de door u gekozen curve die goed weergeeft.



Vraag 2. (20 punten). (Zie bijlage I)

Familie Jansen heeft na een familie-etentje een ernstige voedselvergiftiging opgelopen. Zowel de kleindochter (Marike, 4 jaar, 20 kg) als oma Jansen (75 jaar, 80 kg) worden in het ziekenhuis opgenomen voor behandeling. Beide patiënten worden met het antibioticum cefokeram behandeld. De halfwaardetijd van cefokeram is ongeveer 60 min en het distributievolume is 0.5 L/kg. Cefokeram wordt voornamelijk als onveranderde stof door de nieren geklaard.

Vraag 2A. (4 punten)

Bereken de klaring van cefokeram voor Marike Jansen en voor oma Jansen.

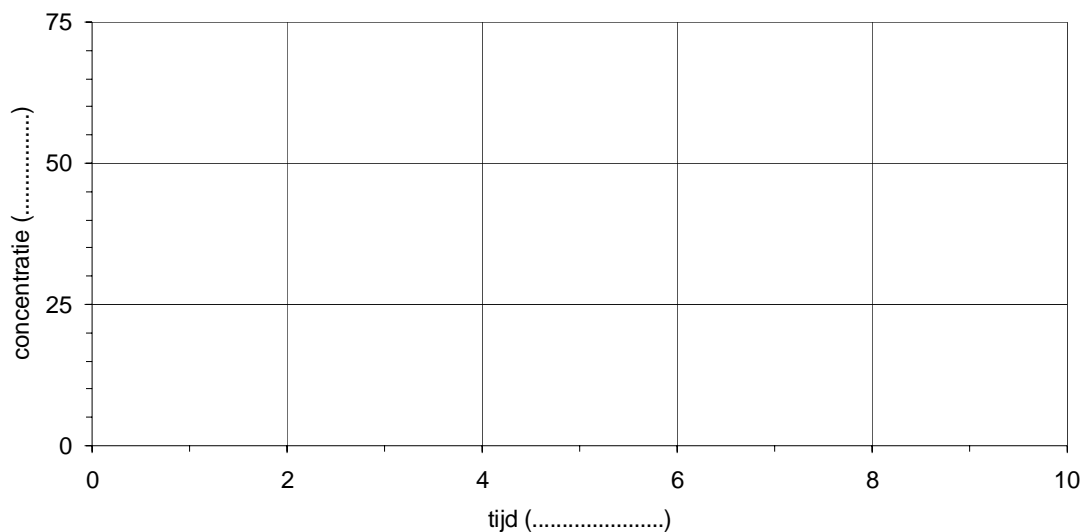
-

-

Vraag 2B. (8 punten)

Marike Jansen krijgt een intraveneus infuus van cefokeram dat ongeveer 1 uur duurt. Tijdens dit infuus wordt in totaal 500 µg cefokeram met een constante snelheid toegediend.

Schets in de onderstaande figuur het concentratie-tijdsprofiel van Cefokeram na toediening van het infuus. Geef een korte toelichting bij de grafiek.



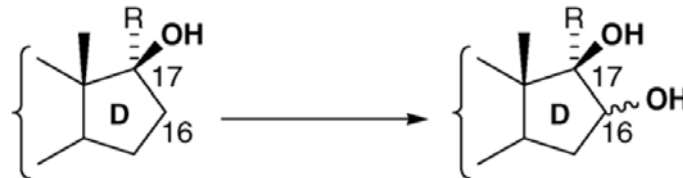
toelichting:

Vraag 2C. (8 punten)

Oma Jansen wordt behandeld met intraveneuze injecties van cefokeram. Geef een praktisch doseringsadvies waarin je aangeeft welke hoeveelheid per dosering gegeven mag worden, en hoe vaak. Het therapeutisch venster van cefokeram is 5-40 ug/L. Licht het antwoord toe.

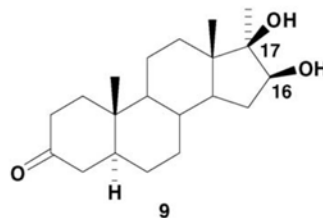
Vraag 3. (20 punten)

In een onderzoekslaboratorium wil men een generieke immunoassay ontwikkelen voor 17α -alkyl steroïde metabolieten in plasma en/of urine. De aanwezigheid van deze metabolieten in plasma en/of urine duidt op misbruik van prestatieverhogende middelen. Doel is te komen tot een screeningsassay voor zowel bekende als onbekende metabolieten van deze groep anabole steroïden.



Figuur I. algemene ringstructuur van 17-alkyl anabole steroïden

Tijdens de ontwikkeling van de screeningsassay worden antilichamen opgewekt tegen onder andere het antigeen 16β -hydroxymestanolone, een van de mogelijke metabolieten (zie figuren I en II).



Figuur II. 16β -hydroxymestanolone

Vraag 3A. (4 punten).

Is het mogelijk een immuunreactie tegen 16β -hydroxymestanolone op te wekken door deze stof direct, dat wil zeggen ongemodificeerd, te injecteren?
Beredeneer waarom wel of niet.

Vraag 3B. (6 punten).

Na selectie blijkt dat de verkregen antilichamen een hoge affiniteit hebben voor de getoonde ringstructuur (zie figuur I). Er is sprake van kruisreactiviteit met metabolieten met dezelfde ringstructuur. Alle geteste stoffen vertonen 85-100% kruisreactiviteit met 16β -hydroxymestanolone.

Wat wordt bedoeld met het begrip kruisreactiviteit? Beredeneer of dit hier nadelig is of niet?

Vraag 3C. (4 punten).

Men besluit een competitieve ELISA te ontwikkelen met het geselecteerde antilichaam. Waarom is het niet voor de hand liggend om een sandwich ELISA te ontwikkelen? Beredeneer waarom wel/niet.

Vraag 3D. (6 punten).

Zet de onderstaande handelingen die worden uitgevoerd tijdens de competitieve ELISA in de juiste volgorde. Let wel: de wasstappen en incubatietijden zijn weggelaten.

- I bepalen extinctie bij 420 nm
- II incubatie met een 1% BSA blocking-oplossing
- III coating van de ELISA plaat met antilichaam
- IV incuberen met TMB-peroxide substraatoplossing tot voldoende kleur is ontwikkeld
- V incubatie met standaarden / monsters
- VI stoppen kleurontwikkeling met zwavelzuur
- VII spiken van standaarden/monsters met HRP-gelabeld antigeen

(HRP: horse-radish peroxidase; BSA: bovine serum albumin; TMB: tetramethylbenzidine)

volgorde:

toelichting:

Vraag 4. (18 punten)

Vraag 4A. (6 punten)

Diazepam en andere benzodiazepines kunnen m.b.v. HPLC (loopmiddel 50% methanol met 0.1% mierenzuur) in serum worden bepaald.

In een laboratorium worden de serum monsters met SPE voorbereid volgens onderstaand protocol:

100 µl serum wordt gespiket met 20 µl interne standaard oplossing (2 µg/ml oxazepam) en er wordt 100 µl buffer aan toegevoegd. Het verdunde monster wordt vervolgens op de SPE kolom gebracht en de kolom wordt 2 keer gewassen met 1 ml buffer. Vervolgens wordt er geëluëerd met 1 ml methanol en drooggedampt onder stikstof. Het residu wordt opgenomen in 200 µl 50% methanol en hiervan wordt 20 µl geïnjecteerd op de HPLC.

Er wordt 100 µl genomen van een standaardoplossing van 0,5 µg/ml en deze standaard wordt vervolgens op dezelfde manier als het monster voorbereid.

Bereken de concentratie diazepam in het serum met behulp van onderstaande gegevens. Laat zien hoe je aan je antwoord komt.

	area diazepam	area oxazepam
standaard	3820	2660
	4109	2941
monster	2899	2870
	2904	2798

Vraag 4B. (4 punten)

In een ander laboratorium wordt er voor gekozen om benzodiazepines uit serum m.b.v. een chloroform-water extractie te extraheren. Hiervoor wordt serum verdund met water en vervolgens 3 maal met chloroform geëxtraheerd. De chloroform-fasen worden samengevoegd en drooggedampt. Het residu wordt opgenomen in 50% methanol en geanalyseerd m.b.v. HPLC. Na de analyse blijkt het gehalte diazepam in het serum lager uit te vallen dan van tevoren werd verwacht.

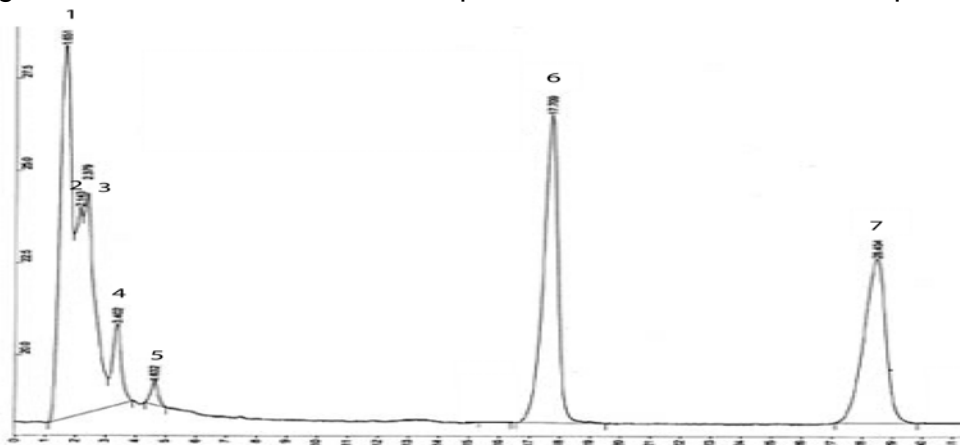
Geef twee manieren om te controleren (zonder een interne standaard te gebruiken) of de extractie volledig is verlopen. Licht je antwoord toe.

-

-

Vraag 4C. (4 punten)

In het chromatogram zijn dicht bij de dode tijd kleine piekjes te zien. Het blijkt hier te gaan om metabolieten van diazepam. Bereken de k' voor deze pieken.



piek nummer	identiteit	retentietijd (min)	k'
1	dode tijd	1.7	
2		2.1	
3		2.9	
4		3.4	
5		4.7	
6	diazepam	17.8	
7	oxazepam	28.4	

Wat zijn de algemene eisen om een component goed te kunnen bepalen m.b.v. HPLC?

Vraag 4D. (4 punten)

Hoe kun je de bovenstaande HPLC methode aanpassen om de metabolieten beter te kunnen bepalen? Geef aan wat voor gevolgen deze aanpassing zal hebben voor de diazepam en oxazepam pieken.

Vraag 5. (18 punten). Gebruik bij deze opgave bijlagen II, III en IV.

Door twee verschillende fabrikanten zijn tabletten gemaakt met codeïnefosfaat met een gedeclareerd gehalte van 10,00 mg. Onderstaande tabel geeft de gevonden gehalten van een aselechte steekproef van 10 individuele tabletten van beide fabrikanten weer. Het gemiddelde gehalte en de gehalten spreiding voor beide fabrikanten zijn hieruit berekend.

tablet	gehaltebepaling	
	Fabrikant A (mg/tablet)	Fabrikant B (mg/tablet)
1	10,4	9,8
2	10,8	10,4
3	11,0	10,0
4	9,9	9,0
5	10,5	9,5
6	9,9	9,6
7	9,8	9,2
8	10,6	10,3
9	9,9	10,7
10	10,4	9,6
gemiddeld gehalte	10,32	9,81
gehalten spreiding (s)	0,424	0,540

Vraag 5A. (6 punten)

Een onderzoeker vraagt zich af of beide charges wat betreft gemiddeld gehalte significant van elkaar verschillen. Voer de juiste statistische toets uit en formuleer een conclusie.

Vraag 5B. (6 punten)

Het 95%-betrouwbaarheidsinterval van het gemiddelde gehalte van fabrikant A loopt van 10,02 tot 10,62. Geef de juistheid aan, inclusief korte toelichting, van onderstaande beweringen:

1. Het gemiddelde van 10,32 ligt binnen dit interval, dus is er bij fabrikant A geen significant verschil met het gedeclareerd gehalte (bij $\alpha=0,05$).
2. Het gemiddelde gehalte van 9,81 ligt buiten dit interval, dus verschilt het gemiddelde van fabrikant B significant van dat van fabrikant A (bij $\alpha=0,05$).

Vraag 5C. (6 punten)

Een onderzoeker voert een dissolutietest uit op anafranil tabletten. De tabletten hebben een zuurresistente coating en bevatten 10 mg van het geneesmiddel. De dissolutietest wordt uitgevoerd volgens de basket methode (apparatus 1) van de Europese Farmacopee. Het gebruikte dissolutiemedium is 1000 ml fosfaatbuffer pH 6.8. De test wordt uitgevoerd op 24 tabletten en levert de volgende gegevens op (concentraties in mg/L):

tablet	conc
1	8.2
2	6.5
3	7.2
4	7.3
5	9.8
6	6.3
7	7.2
8	8.7

tablet	conc
9	9.4
10	6.9
11	5.7
12	7.6
13	7.1
14	8.9
15	8.4
16	6.5

tablet	conc
17	6.8
18	5.4
19	7.3
20	6.3
21	10.2
22	8.6
23	9.3
24	6.8

Voldoen deze tabletten aan de dissolutietest volgens EP 2.9.3?
Geef een toelichting bij je antwoord.

Bijlage I: kinetiek formules

$$Cl = k_e \cdot V_d$$

$$t_{1/2} = 0,693/k_e$$

$$AUC = F \cdot D / Cl$$

$$C_t = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t}$$

$$\ln C_t = \ln C_0 - k_e \cdot t$$

$${}^{10}\log C_t = {}^{10}\log C_0 - (k_e/2,3) \cdot t$$

$$C_0 = D / V_d$$

$$AUC = C_0 / k_e$$

$$C_t = k_a / (k_a - k_e) \cdot (F \cdot D / V_d) \cdot (e^{-k_e \cdot t} - e^{-k_a \cdot t})$$

$$t_{\max} = 1 / (k_a - k_e) \cdot \ln(k_a / k_e)$$

$$C_{\max} = (F \cdot D / V_d) \cdot e^{-k_e \cdot t_{\max}}$$

$$C_{ss} = \frac{R_{inf}}{Cl} \infty$$

$$C = \frac{R_{inf}}{Cl} \cdot (1 - e^{-k \cdot t})$$

$$D_{m,\max} = \frac{V_D}{F} (C_{mtc} - C_{mec})$$

$$\tau_{\max} = \frac{\ln(C_{mtc} / C_{mec})}{k}$$

$$R_{ideal} = D_{m,\max} / \tau_{\max}$$

$$C_{av}^{\infty} = \frac{F \cdot D_0}{Cl \cdot \tau}$$

$$C_{\max}^{\infty} = \frac{F \cdot D_0}{V_D} \cdot \frac{1}{(1 - e^{-k \cdot \tau})}$$

$$C_{\min}^{\infty} = C_{\max}^{\infty} \cdot e^{-k \cdot \tau}$$

Bijlage II: Statistiek formules

$$t = \frac{|\bar{X} - \mu_0|}{s/\sqrt{n}}$$

$$t = \frac{\bar{X}_d}{s_d/\sqrt{n}}$$

$$t = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{s_p * \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Bijlage III: Statistiek tabellen

Kritieke waarden t -verdeling

vrijheidsgraden	significatieniveau					
	tweezijdige test			eenzijdige test		
	0,10	0,05	0,01	0,10	0,05	0,01
1	6,31	12,71	63,66	3,08	6,31	31,82
2	2,92	4,30	9,92	1,89	2,92	6,96
3	2,35	3,18	5,84	1,64	2,35	4,54
4	2,13	2,78	4,60	1,53	2,13	3,75
5	2,02	2,57	4,03	1,48	2,02	3,36
6	1,94	2,45	3,71	1,44	1,94	3,14
7	1,89	2,36	3,50	1,41	1,89	3,00
8	1,86	2,31	3,36	1,40	1,86	2,90
9	1,83	2,26	3,25	1,38	1,83	2,82
10	1,81	2,23	3,17	1,37	1,81	2,76
11	1,80	2,20	3,11	1,36	1,80	2,72
12	1,78	2,18	3,05	1,36	1,78	2,68
13	1,77	2,16	3,01	1,35	1,77	2,65
14	1,76	2,14	2,98	1,35	1,76	2,62
15	1,75	2,13	2,95	1,34	1,75	2,60
16	1,75	2,12	2,92	1,34	1,75	2,58
17	1,74	2,11	2,90	1,33	1,74	2,57
18	1,73	2,10	2,88	1,33	1,73	2,55
19	1,73	2,09	2,86	1,33	1,73	2,54
20	1,72	2,09	2,85	1,33	1,72	2,53
30	1,70	2,04	2,75	1,31	1,70	2,46
40	1,68	2,02	2,70	1,30	1,68	2,42
60	1,67	2,00	2,66	1,30	1,67	2,39
120	1,66	1,98	2,62	1,29	1,66	2,36

Kritieke waarden F -verdeling, $\alpha=0,05$, tweezijdig

Vrijheids- graden noemer	Vrijheidsgraden teller ->									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	647.8	799.5	864.2	899.6	921.8	937.1	948.2	956.6	963.3	968.6
2	38.51	39.00	39.17	39.25	39.30	39.33	39.36	39.37	39.39	39.40
3	17.44	16.04	15.44	15.10	14.88	14.73	14.62	14.54	14.47	14.42
4	12.22	10.65	9.98	9.60	9.36	9.20	9.07	8.98	8.90	8.84
5	10.01	8.43	7.76	7.39	7.15	6.98	6.85	6.76	6.68	6.62
6	8.81	7.26	6.60	6.23	5.99	5.82	5.70	5.60	5.52	5.46
7	8.07	6.54	5.89	5.52	5.29	5.12	4.99	4.90	4.82	4.76
8	7.57	6.06	5.42	5.05	4.82	4.65	4.53	4.43	4.36	4.30
9	7.21	5.71	5.08	4.72	4.48	4.32	4.20	4.10	4.03	3.96
10	6.94	5.46	4.83	4.47	4.24	4.07	3.95	3.85	3.78	3.72

Bijlage IV: monografie EP2.9.3

01/2008:20903

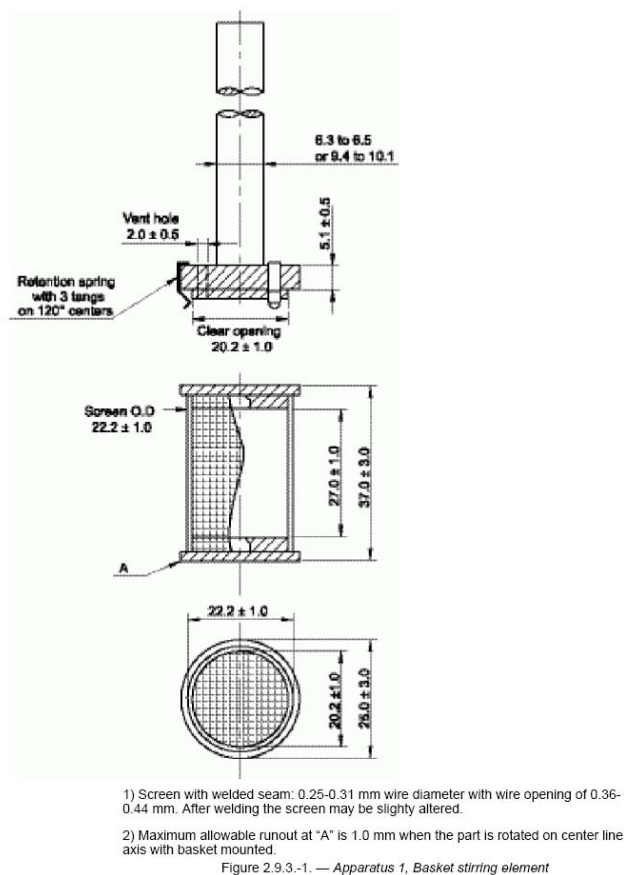
2.9.3. DISSOLUTION TEST FOR SOLID DOSAGE FORMS

This test is provided to determine compliance with the dissolution requirements for solid dosage forms administered orally. In this chapter, a dosage unit is defined as 1 tablet or 1 capsule or the amount specified.

APPARATUS

Apparatus 1 (Basket apparatus). The assembly consists of the following: a vessel, which may be covered, made of glass or other inert, transparent material⁽¹⁾ *(SEE NOTE)*; a motor; a drive shaft; and a cylindrical basket (stirring element). The vessel is partially immersed in a suitable water-bath of any convenient size or heated by a suitable device such as a heating jacket. The water-bath or heating device permits maintaining the temperature inside the vessel at 37 ± 0.5 °C during the test and keeping the dissolution medium in constant, smooth motion. No part of the assembly, including the environment in which the assembly is placed, contributes significant motion, agitation, or vibration beyond that due to the smoothly rotating stirring element. Apparatus that permits observation of the preparation and stirring element during the test is preferable. The vessel is cylindrical, with a hemispherical bottom and a capacity of 1 litre. Its height is 160-210 mm and its inside diameter is 98-106 mm. Its sides are flanged at the top. A fitted cover may be used to retard evaporation⁽²⁾ *(SEE NOTE)*. The shaft is positioned so that its axis is not more than 2 mm at any point from the vertical axis of the vessel and rotates smoothly and without significant wobble that could affect the results. A speed-regulating device is used that allows the shaft rotation speed to be selected and maintained at a specified rate, within ± 4 per cent.

Shaft and basket components of the stirring element are fabricated of stainless steel, type 316 or equivalent, to the specifications shown in Figure 2.9.3.-1.



Dimensions in millimetres

A basket having a gold coating of about $2.5 \mu\text{m}$ (0.0001 inch) thick may be used. The dosage unit is placed in a dry basket at the beginning of each test. The distance between the inside bottom of the vessel and the bottom of the basket is maintained at 25 ± 2 mm during the test.

PROCEDURE

APPARATUS 1 AND 2

Conventional-release solid dosage forms

Procedure. Place the stated volume of the dissolution medium (± 1 per cent) in the vessel of the specified apparatus. Assemble the apparatus, equilibrate the dissolution medium to 37 ± 0.5 °C, and remove the thermometer. The test may also be carried out with the thermometer in place, provided it is shown that results equivalent to those obtained without the thermometer are obtained.

Place 1 dosage unit in the apparatus, taking care to exclude air bubbles from the surface of the dosage unit. Operate the apparatus at the specified rate. Within the time interval specified, or at each of the times stated, withdraw a specimen from a zone midway between the surface of the dissolution medium and the top of the rotating basket or blade, not less than 1 cm from the vessel wall. Where multiple sampling times are specified, replace the aliquots withdrawn for analysis with equal volumes of fresh dissolution medium at 37 °C or, where it can be shown that replacement of the medium is not necessary, correct for the volume change in the calculation. Keep the vessel covered for the duration of the test and verify the temperature of the medium at suitable times. Perform the analysis using a suitable assay method⁽³⁾/SEE NOTE. Repeat the test with additional dosage units.

If automated equipment is used for sampling or the apparatus is otherwise modified, verification that the modified apparatus will produce results equivalent to those obtained with the apparatus described in this chapter, is necessary.

Dissolution medium. A suitable dissolution medium is used. The volume specified refers to measurements made between 20 °C and 25 °C. If the dissolution medium is a buffered solution, adjust the solution so that its pH is within 0.05 units of the specified pH. Dissolved gases can cause bubbles to form, which may change the results of the test. In such cases, dissolved gases must be removed prior to testing⁽⁴⁾/SEE NOTE.

Time. Where a single time specification is given, the test may be concluded in a shorter period if the requirement for minimum amount dissolved is met. Samples are to be withdrawn only at the stated times, within a tolerance of ± 2 per cent.

INTERPRETATION

Conventional-release solid dosage forms

Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the dosage units tested conform to Table 2.9.3.-1. Continue testing through the 3 levels unless the results conform at either S_1 or S_2 . The quantity Q , is the specified amount of dissolved active substance, expressed as a percentage of the labelled content; the 5 per cent, 15 per cent, and 25 per cent values in the Table are percentages of the labelled content so that these values and Q are in the same terms.

Table 2.9.3.-1

Level	Number tested	Acceptance criteria
S_1	6	Each unit is not less than $Q + 5$ per cent.
S_2	6	Average of 12 units ($S_1 + S_2$) is equal to or greater than Q , and no unit is less than $Q - 15$ per cent.
S_3	12	Average of 24 units ($S_1 + S_2 + S_3$) is equal to or greater than Q , not more than 2 units are less than $Q - 15$ per cent, and no is less than $Q - 25$ per cent.

Prolonged-release dosage forms

Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the dosage units tested conform to Table 2.9.3.-2. Continue testing through the 3 levels unless the results conform at either L_1 or L_2 . Limits on the amounts of active substance dissolved are expressed in terms of the percentage of labelled content. The limits embrace each value of Q_i , the amount dissolved at each specified fractional dosing interval. Where more than one range is specified, the acceptance criteria apply individually to each range.

Table 2.9.3.-2

Level	Number tested	Acceptance criteria
L_1	6	No individual value lies outside each of the stated ranges and no individual value is less than the stated amount at the final test time.
L_2	6	The average value of the 12 units ($L_1 + L_2$) lies within each of the stated ranges and is not less than the stated amount at the final test time; none is more than 10 per cent of labelled content outside each of the stated ranges; and none is more than 10 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time.
L_3	12	The average value of the 24 units ($L_1 + L_2 + L_3$) lies within each of the stated ranges, and is not less than the stated amount at the final test time; not more than 2 of the 24 units are more than 10 per cent of labelled content outside each of the stated ranges; not more than 2 of the 24 units are more than 10 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time; and none of the units is more than 20 per cent of labelled content outside each of the stated ranges or more than 20 per cent of labelled content below the stated amount at the final test time.

Delayed-release dosage forms

Acid stage. Unless otherwise specified, the requirements of this portion of the test are met if the quantities, based on the percentage of the labelled content of active substance dissolved from the units tested conform to Table 2.9.3.-3. Continue testing through the 3 levels unless the results of both acid and buffer stages conform at an earlier level.

Table 2.9.3.-3

Level	Number tested	Acceptance criteria
A ₁	6	No individual value exceeds 10 per cent dissolved.
A ₂	6	The average value of the 12 units (A ₁ + A ₂) is not more than 10 per cent dissolved, and no individual unit is greater than 25 per cent dissolved.
A ₃	12	The average value of the 24 units (A ₁ + A ₂ + A ₃) is not more than 10 per cent dissolved, and no individual unit is greater than 25 per cent dissolved.

Buffer stage. Unless otherwise specified, the requirements are met if the quantities of active substance dissolved from the units tested conform to Table 2.9.3.-4. Continue testing through the 3 levels unless the results of both stages conform at an earlier level. The value of *Q* in Table 2.9.3.-4 is 75 per cent dissolved unless otherwise specified. The quantity, *Q*, is the specified total amount of active substance dissolved in both the acid and buffer stages, expressed as a percentage of the labelled content. The 5 per cent, 15 per cent and 25 per cent values in the Table are percentages of the labelled content so that these values and *Q* are in the same terms.

Table 2.9.3.-4

Level	Number tested	Acceptance criteria
B ₁	6	No unit is less than <i>Q</i> + 5 per cent.
B ₂	6	The average value of the 12 units (B ₁ + B ₂) is equal to or greater than <i>Q</i> , and no unit is less than <i>Q</i> - 15 per cent.
B ₃	12	The average value of the 24 units (B ₁ + B ₂ + B ₃) is equal to or greater than <i>Q</i> , not more than 2 units are less than <i>Q</i> - 15 per cent, and no unit is less than <i>Q</i> - 25 per cent.

The following section is published for information

Guidance on dissolution testing

In the determination of the dissolution rate of the active substance(s) of a solid dosage form, the following are to be specified:

- the apparatus to be used, and in cases where the flow-through apparatus is specified, which flow-through cell is to be used;
- the composition, the volume and the temperature of the dissolution medium;
- the rotation speed or the flow rate of the dissolution medium;
- the time, the method and the amount for sampling of the test solution or the conditions for continuous monitoring;
- the method of analysis;
- the acceptance criteria.

The choice of apparatus to be used depends on the physico-chemical characteristics of the dosage form. When a large quantity of dissolution medium is required to ensure sink conditions, or when a change of pH is necessary, the flow-through apparatus may be preferred.

EXPERIMENTAL TESTING CONDITIONS

The use of the basket and the paddle apparatus and the reciprocating cylinder apparatus is generally based on the principle of operating under "sink conditions", i.e. in such a manner that the material already in solution does not exert a significant modifying effect on the rate of dissolution of the remainder. "Sink conditions" normally occur in a volume of dissolution medium that is at least 3 to 10 times the saturation volume.

In general, an aqueous medium is used. The composition of the medium is chosen on the basis of the physico-chemical characteristics of the active substance(s) and excipient(s) within the range of conditions to which the dosage form is likely to be exposed after its administration. This applies in particular to the pH and the ionic strength of the dissolution medium.

The pH of the dissolution medium is usually set between pH 1 and 8. In justified cases, a higher pH may be needed. For the lower pH values in the acidic range, *0.1 M hydrochloric acid* is normally used. Recommended dissolution media are described hereafter.

Water is recommended as a dissolution medium only when it is proven that the pH variations do not have an influence on the dissolution characteristics.

In specific cases, dissolution media may contain enzymes, surfactants, further inorganic substances and organic substances. For the testing of preparations containing poorly aqueous-soluble active substances, modification of the medium may be necessary. In such circumstances, a low concentration of surfactant is recommended; it is recommended to avoid the use of organic solvents.

Gases dissolved in the dissolution medium can affect the results of the dissolution test. This is true, in particular, for the flow-through apparatus where de-aeration of the medium is necessary to avoid the formation of gas bubbles in the flow-through cell. A suitable method of de-aeration is as follows: heat the medium while stirring gently to about 41 °C, immediately filter under vacuum using a filter with a porosity of 0.45 µm or less, with vigorous stirring, and continue stirring under vacuum for about 5 min. Other de-aeration techniques for removal of dissolved gases may be used.

Using the paddle or basket apparatus, the volume of dissolution medium is normally 500-1000 ml. A stirring speed of between 50 r/min and 100 r/min is normally chosen; it must not exceed 150 r/min.

For the flow-through apparatus, the liquid flow rate is normally set between 4 ml/min and 50 ml/min.

QUALIFICATION AND VALIDATION

Due to the nature of the test method, quality by design is an important qualification aspect for *in vitro* dissolution test equipment. Any irregularities such as vibration or undesired agitation by mechanical imperfections are to be avoided.

Qualification of the dissolution test equipment has to consider the dimensions and tolerances of the apparatus. Critical test parameters, such as temperature and volume of dissolution medium, rotation speed or liquid flow rate, sampling probes and procedures have to be monitored periodically during the periods of use.

The performance of the dissolution test equipment may be monitored by testing a reference product which is sensitive to hydrodynamic conditions. Such tests may be performed periodically or continuously for comparative reasons with other laboratories.

During testing, critical inspection and observation are required. This approach is especially important to explain any out-lying results.

Validation of automated systems, whether concerning the sampling and analytical part or the dissolution media preparation and test performance, has to consider accuracy, precision, and the avoidance of contamination by any dilutions, transfers, cleaning and sample or solvent preparation procedures.

DISSOLUTION SPECIFICATIONS FOR ORAL DOSAGE FORMS

The dissolution specification is expressed as the quantity Q of the active substance as a percentage of the content stated on the product label, which is dissolved in a specified time frame.

Conventional-release dosage forms

Unless otherwise specified, the value of Q is 75 per cent. In most cases, when tested under reasonable and justified test conditions at least 75 per cent of the active substance is released within 45 min. Typically, one limit is specified to ensure that most of the active substance is dissolved within the pre-set time period.

In cases where a longer release time than that recommended above is justified, limits at 2 time intervals may be specified.

Prolonged-release dosage forms

A manufacturer's dissolution specification for prolonged-release dosage forms is normally expected to consist of 3 or more points. The first specification point is intended to prevent unintended rapid release of the active substance ('dose dumping'). It is therefore set after a testing period corresponding to a dissolved amount of typically 20 per cent to 30 per cent. The second specification point defines the dissolution pattern and so is set at around 50 per cent release. The final specification point is intended to ensure almost complete release which is generally understood as more than 80 per cent release.

Delayed-release dosage forms

A delayed-release dosage form may release the active substance(s) fractionally or totally according to the formulation design when tested in different dissolution media, e.g. in increasing pH conditions. Dissolution specifications have, therefore, to be decided from case to case.

Gastro-resistant dosage forms require at least 2 specification points in a sequential test and 2 different specifications in a parallel test. In a sequential test, the first specification point is set after 1 h or 2 h in acidic medium and the second one at a pre-set time period of testing in an adequate buffer solution (preferably pH 6.8). Unless otherwise specified, the value of Q is 75 per cent.