



Seminario de Investigación

Universidad CES Facultad de Ciencias y Biotecnología

Verificación de un método bioanalítico para la cuantificación de indapamida en sangre total por UHPLC- MS

Alejandra Sánchez Ortiz, Claribeth Arias Gutiérrez*, Andrés Felipe Torres Grande, Natalia Yepes Jiménez
Programa de Química Farmacéutica, Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES, Medellín, Colombia.

R e s u m e n

Se verificó un método bioanalítico para la cuantificación de indapamida en sangre total por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (UHPLC - MS), el cual fue desarrollado con el propósito de ser aplicado en la fase analítica de un estudio farmacocinético comparativo de bioequivalencia in vivo. Para la verificación, las muestras fueron preparadas por hemólisis y precipitación de proteínas con sulfato de zinc 5%, seguidas de extracción líquido-líquido con metilbutileter y se utilizó clonazepam como estándar interno de trabajo (IS). La separación cromatográfica fue en fase reversa, se empleó una fuente de ionización por electrospray en modo negativo y el sistema de masas fue operado en modo SIM. El tiempo de corrida fue de dos minutos. Se verificó la linealidad del método en un rango de concentración del analito de 1 ng/mL a 60 ng/mL, con un coeficiente de correlación $r^2 = 0,9974$. Además, se verificó la selectividad, exactitud y precisión intra-ensayo para la metodología siguiendo las especificaciones de la guía de validación de métodos bioanalíticos de la EMA. Posteriormente, el método se aplicó en el análisis de muestras reales de un voluntario participante en un estudio de bioequivalencia de un producto de ensayo de tabletas de indapamida 1,5 mg de liberación prolongada frente al producto de referencia Natrilix SR ®. Se determinó la concentración de analito en las muestras y a partir de estas se obtuvieron los perfiles y parámetros farmacocinéticos para el producto de ensayo y de referencia. El método fue selectivo, preciso, exacto y lineal en el rango de concentración evaluado y puede ser aplicado de manera confiable al análisis de muestras de sangre que contengan indapamida.

Palabras clave: indapamida, clonazepam, UHPLC-MS, bioequivalencia, farmacocinética, verificación, bioanalítico, sangre total.

I. Introducción

La indapamida ($C_{16}H_{16}ClN_3O_3S$) es una sulfamoilclorobenzamida indolínica con actividad diurética que además posee propiedades antihipertensivas directas; farmacocinéticamente esta molécula presenta extensa absorción por vía oral, unión a proteínas plasmáticas de alrededor del 77% y una cinética de eliminación de primer orden mediada por metabolismo principalmente hepático (1).

Pertenece a la clase II del Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS) de Gordon Amidón, lo cual significa que este fármaco posee una baja solubilidad y alta permeabilidad en el tracto gastrointestinal (10).

En el Centro de la Ciencia y de la Investigación Farmacéutica – CECIF – se llevó a cabo un estudio clínico de bioequivalencia in vivo, en donde se comparó el comportamiento farmacocinético de una formulación de indapamida tabletas 1,5 mg de liberación prolongada frente a el medicamento de referencia, Natrilix SR® (5).

Aunque la indapamida no se encuentra en el listado de la Resolución 1124/2016 del Ministerio de Salud y la Protección Social de Colombia, anexo técnico no. 2, donde se indican los fármacos para los cuales se exige la presentación de estudios de bioequivalencia en Colombia, el estudio de bioequivalencia in vivo se llevó a cabo, dado que la tecnología de liberación de las tabletas de indapamida es modificada, por lo que se debe obligatoriamente realizar y este debe ser ejecutado bajo condición de ayuno y con alimentos (6). La matriz en que fueron recolectadas las muestras fue sangre total, debido a que la indapamida es absorbida considerablemente y de forma reversible por los eritrocitos (6). De acuerdo con la revisión bibliográfica, la indapamida presente en matrices biológicas ha sido cuantificada principalmente a través de métodos que implican el uso de cromatografía líquida (HPLC) y espectrometría de masas (MS) (4) (7). Por lo tanto, para el análisis de las muestras provenientes de este estudio, el CECIF desarrolló y validó un método bioanalítico para la cuantificación de indapamida en sangre total, utilizando cromatografía líquida de ultra alto desempeño acoplada a espectrometría de masas con ionización por

electrospray (2) (3) (4). Dicho método fue desarrollado tiempo atrás y dado que posterior a la culminación de la etapa clínica del estudio de bioequivalencia se requiere realizar la etapa bioanalítica para analizar las muestras obtenidas, es pertinente llevar a cabo una verificación del método y evaluar su desempeño en la actualidad para así aplicarlo con confianza en este análisis y garantizar la integridad analítica de los resultados que se obtengan a partir de éste.

Por lo anterior el objetivo de este estudio es realizar la verificación del método bioanalítico previamente validado para la cuantificación de indapamida en sangre total por UHPLC-MS mediante la evaluación de los parámetros de selectividad, precisión y exactitud intra-ensayo y linealidad del método, los cuales fueron evaluados bajo las especificaciones descritas en la guía de validación de métodos bioanalíticos de la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) (8).

Finalmente, se consideró relevante la aplicación del método verificado al análisis de muestras reales obtenidas de un voluntario participe del estudio de bioequivalencia, con el fin de retar el método.

II. Metodología

2.1 Sustancias y materiales

El estándar de referencia primario para indapamida fue comprado a la United States Pharmacopeial Convention - USP (North Bethesda, EE. UU) y el clonazepam grado patrón secundario fue fabricado por Bausch & Lomb (Laval, Canadá) .

El medicamento de referencia empleado, Natrilix SR® indapamida 1,5 mg de liberación prolongada, fue producido por LES Laboratoires Servier Industrie (Gidy, Francia).

El producto de ensayo fue fabricado por una compañía farmacéutica colombiana.

El ácido acético, acetonitrilo grado HPLC y el metanol eran de marca Merck (Nueva York, EE. UU), el acetato de amonio y el hidróxido de sodio fueron producidos por Honeywell (Charlotte, EE. UU).

Los reactivos sulfato de zinc heptahidratado, tert-butil-metil-eter, fosfato dibásico de potasio se compraron a Panreac (Barcelona, España).

2.2. Instrumentos

Para la determinación de los analitos se empleó un cromatógrafo líquido de ultra alto rendimiento NEXERA SHIMADZU UHPLC (Kyoto, Japón) acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electro spray y detector de cuadrupolo sencillo LCMS 2020.

2.3. Sistema cromatográfico

La separación cromatográfica se logró mediante una columna Kinetex C18 de 2.1 x 50 mm, 2.6 μ m Phenomenex (Torrance, CA, EE. UU), bajo temperatura ambiente (25 °C) para el horno y el automuestrador. La fase móvil consistió en una mezcla de Buffer (acetato de amonio 1 mM -ácido acético 0.0036%) y acetonitrilo (60:40). El flujo fue entregado a una tasa de 0,4 mL/ minuto. El volumen de inyección fue de 3.0 μ L para cada muestra, y el tiempo de corrida fue de 2 minutos. En el cromatograma la indapamida se encontró en un tiempo de retención de 0,85 min y el clonazepam en 0,87 min.

2.4. Espectrometría de masas

Se empleó una fuente de ionización ESI en modo negativo y los iones se monitorearon en modo SIM. Para la indapamida se monitoreó el ion m/z 363, 9; empleando una energía de colisión de 30 eV y para el clonazepam el ion monitoreado fue m/z 317,7; con una energía de colisión de 25 eV.

2.5. Calibración y control de muestras

Se prepararon dos soluciones stock de indapamida en metanol a 0,3mg/mL y una solución stock de estándar interno en metanol a 0,4 mg/mL. Las soluciones stock de indapamida fueron diluidas con metanol para producir una serie de soluciones estándar de trabajo a concentraciones de 0,06 mg/mL, 6 μ g/mL y 20 ng/mL.

Las soluciones estándar de trabajo para el IS se prepararon con metanol y agua (1:1) a concentraciones de 0,016 mg/mL y 240 ng/mL, a diferencia de la solución a 80 ng/mL, la cual fue diluida solo con metanol.

Se prepararon también siete diferentes soluciones (niveles) de indapamida para la realización de la

curva de calibración en sangre, las concentraciones de dichas soluciones era las siguientes: 1,00 ng/mL; 10,00 ng/mL; 20,00 ng/mL; 30,00 ng/mL; 40,00 ng/mL; 50,00 ng/mL y 60,00 ng/mL, el IS se adicionó a cada uno de estos siete niveles al inicio del procedimiento de extracción. Se emplearon tres niveles de concentración como muestras de control calidad en sangre; bajo, medio y alto, correspondientes a 2,50 ng/mL; 25,00 ng/mL y 55,00 ng/mL respectivamente. Estas soluciones se prepararon a partir de una solución stock independiente a la utilizada para la preparación de los estándares de calibración, el IS se adicionó exactamente como se hizo para los niveles de la curva.

2.6. Procesamiento de la muestra

A 500,0 μ L de sangre descongelada a temperatura ambiente se le añadió 50,0 μ L de una solución de clonazepam (IS) a 240 ng/mL y se agitó en vortex. Posteriormente se adicionaron 500,0 μ L de una solución de sulfato de zinc 5%, inmediatamente se vertieron 100,0 μ L de Buffer fosfato 0,5 M y 5,0 mL de tert-butil-metil-eter, seguidamente se centrifugó. La fase orgánica se extrajo y se llevó a sequedad a 37 °C mediante corriente de nitrógeno, el remanente se reconstituyó con agua: acetonitrilo (90:10), esta nueva solución se filtró bajo presión mediante jeringa PTFE de 0,22 μ m a viales para cromatografía, para su posterior inserción e inyección (3,0 μ L) en el sistema UHPLC - MS.

2.7. Verificación del método bioanalítico

En el Centro de la Ciencia y de la Investigación Farmacéutica – CECIF – Colombia se validó un método para la cuantificación de indapamida en sangre total por UHPLC-MS. En este trabajo se realizó una verificación de este método en cuanto a los parámetros de selectividad, precisión y exactitud intra-ensayo y linealidad. Estos parámetros se evaluaron en un mismo día y los estándares de calibración se analizaron por duplicado para cada una de sus concentraciones. Las muestras QC de concentración baja, media y alta, fueron analizadas por sextuplicado en una sola secuencia, de este modo se evaluó la precisión y la exactitud. Para evaluar la selectividad se tomaron tres blancos de sangre total de fuentes diferentes a las cuales se les realizó su

respectivo proceso de extracción. También, se enriqueció una muestra blanco de sangre total con indapamida equivalente al LLOQ y posteriormente se inyectó cada una de estas por duplicado en el sistema UHPLC-MS.

La linealidad fue verificada a partir de series de estándares de calibración los cuales fueron preparados a partir de concentraciones conocidas de soluciones de trabajo del analito en sangre total, esto se hizo con siete diferentes niveles. Los datos obtenidos en el análisis de la curva de calibración en sangre total se determinaron mediante un modelo de regresión lineal ponderado, con factor de ponderación $1/x^2$. En el análisis de cada secuencia cromatográfica se incluyó el conjunto de estándares de calibración y muestras de QC bajo, medio y alto por duplicado. (3)

Para determinar la aptitud del sistema se realizó un ensayo en el cual se corrió muestras del nivel 4 de la curva de calibración al inicio y al final de la secuencia cromatográfica; también se realizó una prueba señal ruido utilizando el LLOQ como muestra.

2.8. Aplicación del método un estudio de bioequivalencia

El método bioanalítico UHPLC-MS en cuestión se diseñó originalmente para su aplicación en el análisis de las muestras obtenidas de los voluntarios participantes de un estudio de bioequivalencia in vivo de indapamida tabletas 1,5 mg de liberación prolongada.

En el estudio participaron 15 hombres y 15 mujeres sanos. Todos firmaron el consentimiento informado y el protocolo del estudio fue aprobado previamente por el Comité de Ética de la Universidad CES y el INVIMA. Se comparó el producto de ensayo indapamida 1,5 mg tabletas de liberación prolongada producido por un Laboratorio colombiano con el producto de referencia Natrilix SR® 1,5 mg tabletas de liberación prolongada producido por Les Laboratoires Servier Industrie (sección 2.1).

El estudio se llevó a cabo bajo condición de ayuno, mediante un diseño Cruzado 2x2, de dosis única, con dos tratamientos, dos periodos o ciclos, dos secuencias y un tiempo de lavado de dos semanas

entre la administración de las dosis de cada producto ensayo o referencia. De cada voluntario se recolectaron muestras de aproximadamente 10,0 mL de sangre venosa en tubos heparinizados antes de la administración de la dosis y en los tiempos 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0; 8,0; 9,0; 10,0; 11,0; 12,0; 13,0; 14,0; 16,0; 18,0; 24,0; 36,0; 48,0; 60,0; 72,0 y 96,0 h después de la administración de la dosis. Las muestras se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis. Para este artículo se realizó una pequeña aplicación del método empleando muestras de un voluntario que participó en un estudio de bioequivalencia. (9)

III. Resultados y Discusión

3.1. Separación y cuantificación

La separación cromatográfica del extracto reconstituido en fase móvil (mezcla de Buffer (acetato de amonio 1 mM -ácido acético 0.0036% y acetonitrilo 60:40)) se realizó en fase reversa empleando una columna C18.

Los compuestos indapamida y clonazepam exhibieron un tiempo aproximado de retención de 0,85 min y 0,87 min respectivamente.

En la espectrometría de masas, los parámetros que involucran la temperatura de nebulización, la temperatura del calentador, la velocidad de flujo del gas nebulizador y el gas de cortina se optimizaron para obtener los fragmentos desprotonados de indapamida y clonazepam (IS). La energía de colisión se optimizó para lograr la respuesta máxima de la relación masa carga (m/z). Los iones seguidos fueron 363,9 m/z y 313,7 m/z para indapamida y clonazepam (IS) respectivamente.

Las estructuras de los iones generados y seguidos por el espectrómetro de masas se muestran en la **figura 1** y los cromatogramas correspondientes a los analitos indapamida y clonazepam (IS) se evidencian en la **figura 2**. En la **tabla 1** se muestran los parámetros cromatográficos obtenidos.

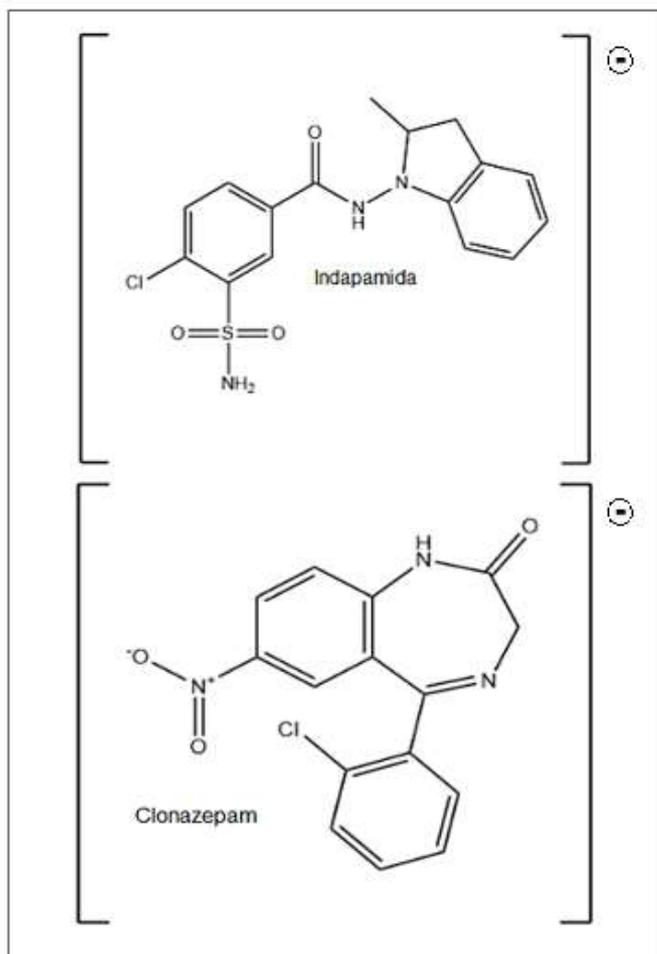


Figura 1. Estructuras de iones generados y seguidos por el espectrómetro de masas para clonazepam m/z 313,7 e indapamida m/z 363,9.

Tabla 1. Parámetros cromatográficos para indapamida y clonazepam (IS) con el método UHPLC-MS.

Nombre del analito	Tiempo de retención (min)	m/z	Área	Factor tailing
Indapamida	0,807	363,90	78061	1,272
Clonazepam	0,838	313,70	57913	1,221

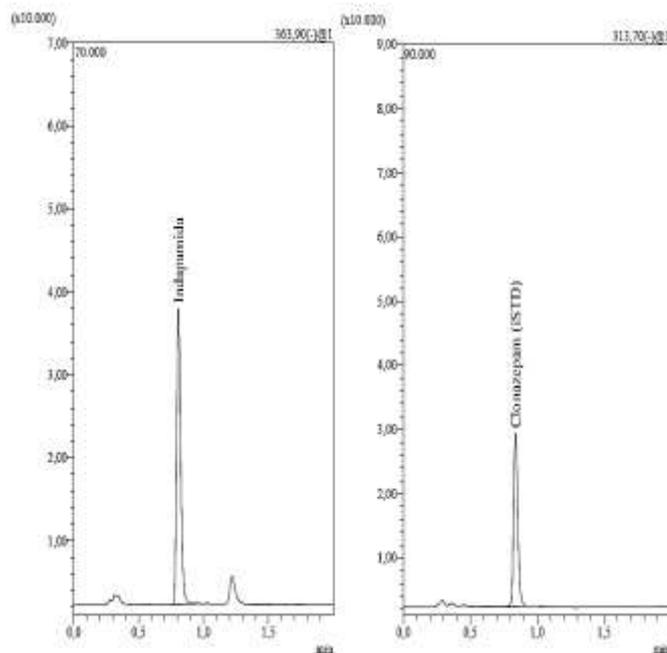


Figura. 2. Cromatogramas de indapamida y clonazepam.

3.2. Verificación

3.2.1. Precisión y exactitud

Los resultados de exactitud y los resultados de precisión intra-ensayo se resumen en la **tabla 2**.

La precisión intra-ensayo se evaluó calculando el porcentaje del coeficiente de variación observado en el análisis de muestras para los QC. La exactitud se expresó como porcentaje de error relativo.

Como criterio de aceptación para la exactitud las concentraciones experimentales calculadas de los QC deben estar dentro del 15 % del valor nominal y las concentraciones experimentales calculadas para el LLOQ deben estar dentro del 20 % del valor nominal en función de porcentaje de error relativo. Para la evaluación de la precisión intra-ensayo, el coeficiente de variación de las concentraciones experimentales calculadas de los QC deben estar dentro del 15 % y del 20% para el LLOQ. Como se observa en la **tabla 2**, las muestras analizadas cumplieron con estos criterios de aceptación, verificando que el método tiene adecuada precisión y exactitud intra-ensayo.

Tabla 2. Resultados de la determinación de la exactitud y precisión intra-ensayo para el método ($n=6$ réplicas).

Concentración nominal (ng/mL)	Intra-ensayo (n=6)		
	Concentración experimental (ng/mL)	Precisión (CV%)	Exactitud (ER %)
LLOQ = 1,00	0,37	3,97	16,42
QC bajo= 2,49	2,09	4,98	4,20
QC medio= 24,75	22,54	11,99	9,73
QC alto= 54,57	52,35	4,27	5,65
%CV: porcentaje de coeficiente de variación			
%ER: porcentaje de error relativo			

3.2.2. Selectividad

La selectividad del método se verificó comparando los cromatogramas obtenidos de tres muestras de blanco (de diferentes fuentes) con los cromatogramas de una muestra extraída de sangre total enriquecida con una concentración equivalente a la del Límite Inferior de Cuantificación (LLOQ).

Todas las muestras se analizaron utilizando el procedimiento de extracción descrito en el numeral 2.6, las condiciones de UHPLC-MS predefinidas y fueron inyectadas al sistema por duplicado.

Los cromatogramas de los blancos no mostraron interferencias significativas de sustancias endógenas en los tiempos de retención de indapamida y clonazepam para los cromatogramas del LLOQ.

Por lo anterior, el método es selectivo para el analito y el estándar interno.

3.2.3. Linealidad y LLOQ

Se realizó una curva de calibración para la cuantificación del analito en la matriz biológica, para esto se analizaron por duplicado siete diferentes niveles de concentración de indapamida, 1,0 ng/mL; 10,0 ng/mL; 20,0ng/mL; 30,0ng/mL; 40,0ng/mL; 50,0ng/mL; 60,0ng/mL y también se analizaron los controles de calidad alto, medio, bajo; por duplicado. Con el fin de garantizar que el modelo obtenido fuese lo más ajustado posible y que tuviese una respuesta lineal para todo el rango de cuantificación esperado, se evaluó la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene, una vez confirmada la

heterocedasticidad de este modelo, se procedió a evaluar los resultados de la curva de calibración

mediante el método de regresión lineal por mínimos

cuadrados ponderados, evaluando diferentes factores de ponderación y seleccionando como el más adecuado el factor de ponderación $1/x^2$, esto también de acuerdo con lo definido por el CECIF en la validación del método. Este factor fue seleccionado debido a que arroja una pendiente e intercepto tal que los porcentajes de error relativo para las concentraciones del analito determinadas en los siete niveles de la curva cumplieron con ser menores del 20% para el límite inferior de cuantificación y del 15% para los demás niveles de la curva.

La pendiente obtenida al aplicar el factor de ponderación fue 0,02772X y el intercepto fue 0,00341.

$$y = 0,02772 x + 0,00341$$

Ecuación 1. Modelo de regresión lineal ajustado para la curva de calibración

El coeficiente r^2 para el modelo ponderado fue de 0,9974; esto indica una muy fuerte correlación lineal positiva entre la concentración del analito y la relación de las áreas cromatográficas ($A_{indapamida}/A_{clonazepam}$).

En la **tabla 3** se describen los resultados para los controles de calidad y se puede observar que para los tres niveles de concentración el %ER es menor que el 15%, cumpliendo con la especificación.

Por lo anterior, se asegura que el método es lineal y se puede emplear para cuantificar indapamida en muestras que la contengan a concentraciones dentro del rango verificado.

Tabla 3. Niveles de la curva de calibración y sus respectivos porcentajes de error relativo.

Niveles de la curva de calibración	[nominal del analito] ng/mL	[Experimental del analito] ng/mL	% ER
1	1,00	0,99	2,17
2	10,14	10,58	4,39
3	19,68	20,40	3,51
4	29,82	28,37	6,93
5	39,96	40,68	6,43
6	49,51	48,47	2,87
7	59,64	58,35	2,16

3.3. Aplicación farmacocinética

Para la aplicación del método verificado se seleccionaron las muestras de un solo voluntario de un estudio de bioequivalencia de indapamida tabletas 1,5 mg de liberación prolongada bajo condición de ayuno. Dicho voluntario recibió una sola dosis de producto por ciclo; en el ciclo 1 el voluntario recibió el producto de ensayo y en el ciclo 2 recibió el producto de referencia, Natrilix SR®.

Un total de 48 muestras fueron analizadas por duplicado empleando la curva de calibración ponderada y previamente verificada. Se calcularon las concentraciones de indapamida en las muestras del voluntario para ambos ciclos y se obtuvo los perfiles farmacocinéticos del producto de ensayo y el de referencia, tal como se aprecian en la **figura 3**. Adicionalmente, las concentraciones obtenidas se procesaron para determinar los principales parámetros farmacocinéticos para el producto de ensayo y de referencia, tal como se muestran en la **tabla 4**.

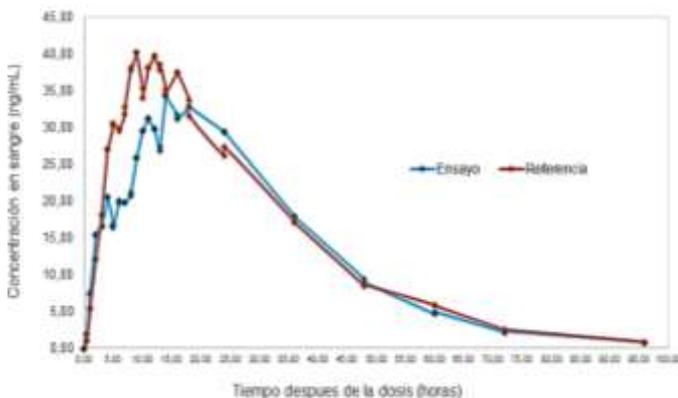


Figura 3. Perfiles farmacocinéticos obtenidos para el producto de ensayo y de referencia (Natrilix SR

®), indapamida 1,5 mg tabletas de liberación prolongada, para un sujeto bajo condición de ayuno.

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos calculados para el producto de ensayo y de referencia.

Parámetro	Producto de Referencia	Producto de Ensayo
Concentración Máxima (Cmax)	40.20 ng/mL	34.37 ng/mL
Tiempo Máximo (Tmax)	9 horas	14 horas
Volumen de Distribución (Vd)	24,66 litros	21,62 litros
Tiempo de Vida Media (t½)	15,02 horas	12,10 horas
AUC (0 - t)	1263.527 ng*h/mL	1172.205 ng*h/mL
AUC (0 - ∞)	1318.581 ng*h/mL	1211.669 ng*h/mL

Dado que con la cuantificación del analito en las muestras fue posible obtener perfiles y parámetros farmacocinéticos coherentes tanto para el producto de ensayo como para el de referencia, puede afirmarse que el método verificado es adecuado para ser empleado en el análisis de las muestras de estudios de bioequivalencia o farmacocinéticos de indapamida 1,5 tabletas de liberación prolongada, generando resultados de calidad y confiables.

III. Conclusión

Se verificó que el método bioanalítico previamente validado para la cuantificación de indapamida en sangre total, es selectivo, preciso, exacto y lineal en el rango de concentración evaluado, por lo tanto, puede ser aplicado de manera confiable en el análisis de muestras provenientes de estudios farmacocinéticos y de bioequivalencia de tabletas de indapamida 1,5 mg de liberación prolongada.

Referencias

1. Campbell, D. B., Taylor, A. R., Hopkins, Y. W., & Williams, J. R. B. (1977). Pharmacokinetics and metabolism of indapamide: a review. *Current Medical Research and Opinion*, 5(sup1), 13-24.
2. Tang, J., Li, J., Sun, J., Yin, J., & He, Z. (2005). Rapid and sensitive determination of indapamide in human blood by liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection: application to a bioequivalence study. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 60(11), 819-822.
3. Grebow, P. E., Treitman, J. A., Yeung, A. K., & Johnston, M. M. (1981). Semiautomated assay for indapamide in biological fluids. *Journal of pharmaceutical sciences*, 70(3), 306-308.
4. Jain, D. S., Subbaiah, G., Sanyal, M., Pande, U. C., & Shrivastav, P. (2006). Liquid chromatography–tandem mass spectrometry validated method for the estimation of indapamide in human whole blood. *Journal of Chromatography B*, 834(1-2), 149-154..
5. Hang, T. J., Zhao, W., Liu, J., Song, M., Xie, Y., Zhang, Z., ... & Zhang, Y. (2006). A selective HPLC method for the determination of indapamide in human whole blood: Application to a bioequivalence study in Chinese volunteers. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(1), 202-205.
6. Resolución 1124 de 2016 [Internet]. [citado 24 de junio de 2020]. Disponible en: <https://paginaweb.invima.gov.co/images/bioequivalencia/Resoluci%C3%B3n%201124%20de%202016.pdf>
7. Gao X, Chen J, Mei N, Tao W, Jiang W, Jiang X. HPLC Determination and Pharmacokinetic Study of Indapamide in Human Whole Blood. *Chromatographia*. junio de 2005;61(11-12):581-5.
8. Guideline on bioanalytical method validation [Internet]. [citado 23 de agosto de 2019]. Disponible en: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf.
9. Li, G., Zhang, X., Tian, Y., Zhang, Z., Rui, J., & Chu, X. (2013). Pharmacokinetics and Bioequivalence Study of Two Indapamide Formulations after Single-dose Administration in Healthy Chinese Male Volunteers. *Drug research*, 63(01), 13-18.
10. Katalin, K. É., Kelemen, L. J., Gyéresi, Á., Silvia, I., & Mona, O. Development of a Dissolution Method for Modified Release Tablets Containing an Insoluble Active Substance.