

Development and Validation of HPLC-MS Method of Determination of Memantine Hydrochloride for Study of Dissolution Profiles

A.V. Yegorova[†], Yu.V. Skrypynets[†], I.I. Leonenko[†], G.V. Maltsev[‡], S.N. Kashutskyy[‡], O.D. Voitiuk[‡]

[†] A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] "INTERCHEM", Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

Received: March 17, 2021; Accepted: May 01, 2021

DOI: 10.17721/moca.2021.71-80

A method for quantitative determination of memantine hydrochloride by HPLC with mass spectrometric detection (HPLC-MS), suitable for the study of dissolution profiles of tablets "Mematon IC" was developed. Chromatographic determination was performed using a mobile phase of methanol - 0.1% (v/v) aqueous solution of formic acid (55:45) on a column of Zorbax Eclipse Plus C18 size 10 cm × 4.6 mm (3.5 μm) at a flow rate of 1 ml/min. The linearity interval in the appropriate dissolution media is 35 - 150% of the normalized content of memantine hydrochloride in the tablet. The method is validated on the parameters of specificity, accuracy, correctness, linearity in the studied range of concentrations, robustness. The stability of the tested solutions and reference solutions in the case of their storage at room temperature for 24 hours was confirmed. It is established that in the case of the study of solutions prepared in a dissolution medium of 0.1 M hydrochloric acid solution pH 1.2, there is a need to pre-neutralize hydrochloric acid before analysis, because it, as stronger than formic acid, almost completely ionizes all dissolved molecules, which leads to a significant deviation of the linear dependence of the analytical signal on the concentration of the analyte. Neutralization is performed with 0.1 M sodium hydroxide solution, which is added to the sample of the test solution. The release of more than 85% of memantine hydrochloride in 15 min in all dissolution media indicates the similarity of the dissolution profiles and does not require the calculation of the similarity factor f_2 .

Keywords: high performance liquid chromatography, mass spectrometry, dissolution profiles, memantine hydrochloride

Розробка та валідація ВЕРХ-МС методики визначення мемантину гідрохлориду для вивчення профілів розчинення

А.В. Єгорова[†], Ю.В. Скрипинець[†], І.І. Леоненко[†], Г.В. Мальцев[‡], С.М. Кашуцький[‡], О.Д. Войтюк[‡]

[†] Фізико-хімічний інститут ім. О.В. Богатського Національної Академії Наук України, вул. Люстдорфська дорога, 86, м. Одеса, 65080; *e-mail: yegorova@interchem.com.ua

[‡] ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

Надійшла: 17 березня 2021 р; Прийнята: 01 травня 2021 р

DOI: 10.17721/moca.2021.71-80

Розроблено методику кількісного визначення мемантину гідрохлориду методом ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС), придатну для дослідження профілів розчинення таблеток «Мематон ІС». Хроматографічне визначення проводили за допомогою мобільної фази метанол - 0.1% (об/об) водний розчин мурашиної кислоти (55:45) на колонці Zorbax Eclipse Plus C18 розміром 10 см × 4.6 мм (3.5 мкм) при швидкості потоку 1 мл/хв. Інтервал лінійності у відповідних середовищах розчинення становить 35 - 150% від нормованого вмісту мемантину гідрохлориду в таблетці. Методику валідавано за показниками специфічність, точність, правильність, лінійність у вивченому діапазоні концентрацій, робастність. Підтверджено стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння у разі їх зберігання за кімнатної температури протягом 24 год. Встановлено, що у разі дослідження розчинів, приготованих в середовищі 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти рН 1.2, виникає необхідність попередньої нейтралізації хлористоводневої кислоти перед проведенням аналізу, оскільки вона, як сильніша порівняно з мурашиною кислотою, практично повністю іонізує всі розчинені молекули речовини, що призводить до значного відхилення лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації аналіту. Нейтралізацію проводять 0.1 М розчином натрію гідроксиду, який додається до проби випробовуваного розчину. Вивільнення більше 85% мемантину гідрохлориду за 15 хв у всіх середовищах розчинення говорить про подібність профілів розчинення та не вимагає розрахунку фактора подібності f_2 .

Ключові слова: вискоєфективна рідинна хроматографія, мас-спектромерія, профілі розчинення, мемантину гідрохлорид

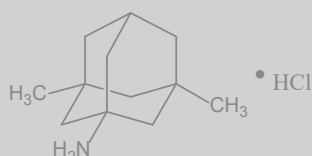
Одним із важливих напрямів характеризувannya твердих лікарських форм є вивчення профілів розчинення, яке здійснюють як на етапі розроблення лікарського препарату (ЛП), так і протягом його життєвого циклу. За допомогою вивчення профілів розчинення можна визначити чинники, які впливають на швидкість вивільнення активного фармацевтичного інгредієнта (АФІ), оцінити відтворюваність продукту під час внесення змін до складу лікарського засобу [1].

При встановленні еквівалентності дженерики можна порівнювати зі стандартом (оригінальний препарат або ЛП, визнаний як препарат порівняння) за профілем розчинення, що отримується по 3-6 точкам, з використанням розрахункових коефіцієнтів подібності, рекомендованих FDA [2]. Слід зазначити, що в останні роки зросла кількість публікацій по вивченню якості дженериків з використанням тесту «Розчинення» [3-6].

Визначення еквівалентності *in vitro* - це випробування, яке призначене для оцінки еквівалентності профілів розчинення досліджуваного і референтного ЛП в трьох середовищах розчинення зі значеннями рН 1.2; 4.5 і 6.8.

При побудові профілів розчинення необхідно виконувати ряд умов: кількість застосовуваних в розрахунку точок повинно бути не менше 3; умови випробування порівнюваних лікарських препаратів повинні бути однаковими; відбір проб повинен проводитися через однакові проміжки часу; після досягнення вивільнення рівня 85% з обох ЛП, в розрахунок повинні прийматися всі точки до цього рівня і одна наступна; коефіцієнт варіації для першої точки повинен бути не більше 20%, для наступних - не більше 10%. Для порівняння профілів розчинення використовують коефіцієнт відмінності (f_1) і коефіцієнт подібності (f_2). Для профілів, які вважаються подібними, значення f_1 має бути близько до 0, а значення f_2 - до 100. Значення f_1 , що знаходиться в межах від 0 до 15, а значення f_2 - в межах від 50 до 100, гарантує схожість або еквівалентність двох профілів та відповідно еквівалентність фармакологічної дії випробовуваного препарату та препарату порівняння [7].

Мемантину гідрохлорид (МГ) є помірноафінним неконкурентним антагоністом NMDA-рецепторів:



1-аміно-3,5-диметиладамантан гідрохлорид (МГ)

Для визначення МГ в тесті «Розчинення» використовують метод газової хроматографії [8]. Ця методика через необхідність екстрагування АФІ складна для вивчення профілів розчинення.

МГ також визначають методами високо-ефективної рідинної хроматографії з спектрофотометричним (СФ) [9], флуоресцентним (Фл) [10] або мас-спектрометричним детектуванням [11]. Для кількісного ВЕРХ-СФ визначення мемантину гідрохлориду, в молекулі якого відсутні хромофорні групи, необхідно екстрагувати препарат та провести його дериватизацію денсилом. Для кількісного ВЕРХ-Фл визначення дериватизацію проводили 9-флуоренілметилхлороформіатом. Перевагами цих методик є порівняно низька вартість аналітичного обладнання та достатня чутливість, але при цьому необхідна довготривала та коштовна підготовка проби до хроматографічного аналізу. Метод рідинної хроматографії з мас-спектрометричним детектором дозволяє спростити пробопідготовку. В роботі [11] хроматографування проводили за таких умов: колонка Prodigy ODS(3) розміром 100 мм × 4.6 мм, розмір частинок – 5 мкм; об'єм проби, що вводиться – 100 мкл; швидкість потоку рухомої фази – 0.8 мл/хв; рухома фаза: А – 0.1% розчин мурашиної кислоти у воді, рухома фаза: В – 0.1% розчин мурашиної кислоти у метанолі, градієнтне елювання, час утримування МГ 3.5 хв.

Метою цієї роботи було розроблення та валідація методики кількісного визначення мемантину гідрохлориду методом ВЕРХ з мас-спектрометричним детектуванням (ВЕРХ-МС), придатної для дослідження профілів розчинення таблеток лікарського засобу «Мематон ІС» у різних середовищах.

Матеріали та методи дослідження

Визначення було виконано відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [12] за пунктами 2.9.3 та 2.2.29. Як середовища розчинення використовували 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2; ацетатний буферний розчин рН 4.5; фосфатний буферний розчин рН 6.8, що приготувані відповідно до ДФУ (5.17.1).

Дегазацію середовищ проводили на приладі MediPrep 821 EPWEKA (Німеччина).

У роботі використовували ваги лабораторні електронні AUX220 (SHIMADZU, Японія). Для приготування розчину А та середовищ розчинення використовують магнітну мішалку ARE (VELP Scientifica, Італія).

Воду для хроматографії отримували з використанням системи очищення води arium® pro UV фірми Sartorius.

рН буферних розчинів вимірювали на рН-метрії серії Seven Easy фірми Mettler Toledo.

Хроматограми реєстрували на комплексній системі високоефективної рідинної хроматомас-спектрометрії: рідинний хроматограф 1260 Infinity, детектор 6530 Accurate Mass Q-TOF (Agilent Technologies, США) з використанням колонок з нержавіючої сталі: Zorbax Eclipse Plus C₁₈

розміром 10 см × 4.6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3.5 мкм та Agilent Poroshell 120 EC-C18 розміром 10 см × 4.6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 2.7 мкм (альтернативна).

Об'єктом дослідження був препарат «Мематон ІС, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг» (виробник - ТДВ «ІНТЕРХІМ») та референтний препарат «АБІКСА, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг» (виробник – Х. Лундбек А/С, Данія).

Об'єм середовища розчинення становив 900 мл, швидкість обертання кошика – 100 об/хв, час розчинення – 45 хв з точками відбору: 10, 15, 30, 45 хв.

Використано систему для визначення ступеня розчинення твердих дозованих форм ERWEKA DT1612 (Німеччина), яка призначена для автоматичного відбору 12 зразків через встановлені інтервали часу з автоматичною фільтрацією проб.

Випробовуваний розчин (0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2). У циліндричну посудину напівавтоматичного приладу з кошиком поміщають 1 таблетку. Через 10, 15, 30, 45 хв після початку розчинення проби мірною піпеткою на 10.0 мл відбирають проби в мірні колби місткістю 100.0 мл, додають 10.0 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, доводять водою до позначки та перемішують, фільтрують крізь мембранний фільтр (0.20 мкм; RC 25).

Випробовуваний розчин (ацетатний буферний розчин рН 4.5; фосфатний буферний розчин рН 6.8). У циліндричну посудину напівавтоматичного приладу з кошиком поміщають 1 таблетку. Через 10, 15, 30, 45 хв після початку розчинення проби об'ємом 10.0 мл автоматично відбираються та фільтруються крізь мембранні фільтри (0.20 мкм) у пробірки місткістю 10.0 мл.

Розчин А. 100.0 мг РСЗ мемантину гідрохлориду поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 50 мл води, розчиняють, доводять об'єм розчину тим же розчинником до позначки та перемішують.

Розчин порівняння (0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2). 1.0 мл розчину А поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, доводять водою до позначки та перемішують.

10.0 мл одержаного розчину поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, додають 10.0 мл 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти рН 1.2, 10.0 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду, доводять водою до позначки та перемішують, фільтрують крізь

мембранний фільтр (0.20 мкм; RC 25).

Розчин порівняння (ацетатний буферний розчин рН 4.5, фосфатний буферний розчин рН 6.8). 1.0 мл розчину А поміщають в мірну колбу місткістю 100.0 мл, доводять відповідним буферним розчином до позначки та перемішують, фільтрують крізь мембранний фільтр (0.20 мкм; RC 25).

Хроматографування здійснювали за таких умов: колонка з нержавіючої сталі розміром 10 см × 4.6 мм, заповнена силікагелем октадецилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3.5 мкм; рухома фаза: суміш метанол - 0.1% (об/об) водний розчин мурашиної кислоти (55:45); швидкість рухомої фази: 1.0 мл/хв; температура колонки: 35 °С; об'єм інжекції: 10 мкл (0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2) та 1 мкл (ацетатний буферний розчин рН 4.5, фосфатний буферний розчин рН 6.8); час проведення аналізу: 4 хв; детектування за іонним струмом протонованого молекулярного іону мемантину ($m/z(MH^+) = 180.18$); спосіб іонізації: електро-розпилення при атмосферному тиску; температура газу: 300 °С; швидкість газу: 13 л/хв; розпилювач: 45 psi; напруга на капілярі: 4500 В.

Хроматографують випробовуваний розчин і розчин порівняння.

Хроматографічна система вважається придатною, якщо відносне стандартне відхилення для площ піків мемантину на хроматограмах розчинів порівняння відповідає вимогам ДФУ (2.2.46 N).

Кількість мемантину гідрохлориду (X_n), яка перейшла в розчин з таблетки (0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2), в кожній часовій точці пробовідбору, у відсотках, обчислюють за формулою 1.

Кількість мемантину гідрохлориду (X_n), яка перейшла в розчин з таблетки (ацетатний буферний розчин рН 4.5; фосфатний буферний розчин рН 6.8), в кожній часовій точці пробовідбору, у відсотках, обчислюють за формулою 2.

Результати дослідження

Детектування мемантину гідрохлориду проводили за допомогою мас-селективного детектора в режимі моніторингу іонів, утворених внаслідок позитивної іонізації шляхом іонного розпилення.

Ідентифікація МІ проводилась за одержаним мас-спектром з характерним піком молекулярного іона $(M+H)^+$ с m/z 180.18. У мас-спектрі також присутній слабоінтенсивний пік $(2M+Na)^+$ с m/z 202.16 (рис. 1).

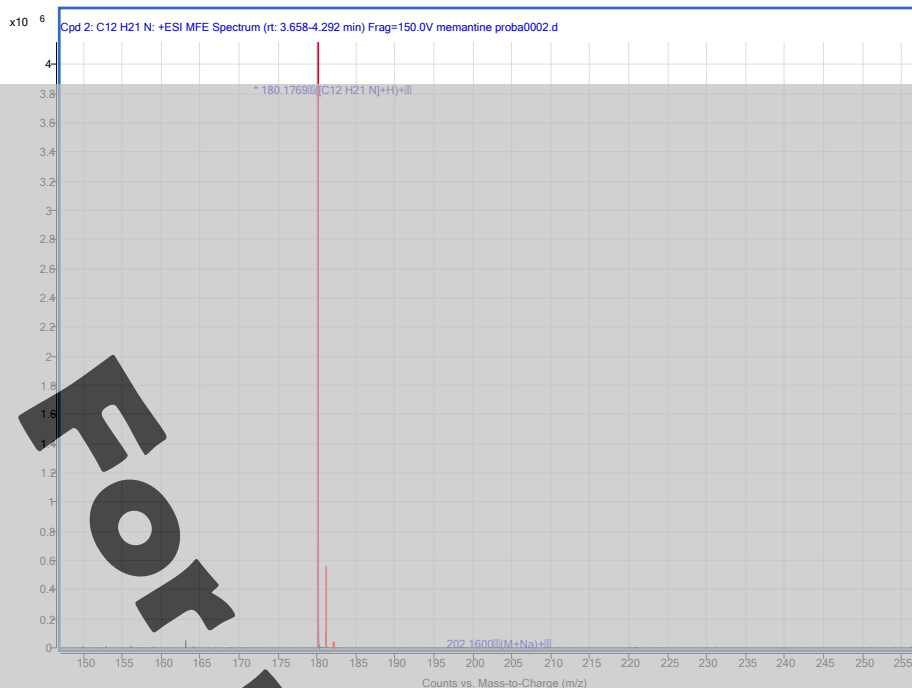


Рис. 1. Мас-спектр мемантину гідрохлориду з іонізацією електророзпиленням за атмосферним тиском.

$$X_n = \frac{S \cdot m_0 \cdot I \cdot 100 \cdot V_n \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot (a - \sum_{l=1}^n b_l) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 10 \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot V_n \cdot P}{S_0 \cdot (a - \sum_{l=1}^n b_l) \cdot 10000}, \quad (1)$$

$$X_n = \frac{S \cdot m_0 \cdot I \cdot V_n \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot (a - \sum_{l=1}^n b_l) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100} = \frac{S \cdot m_0 \cdot V_n \cdot P}{S_0 \cdot (a - \sum_{l=1}^n b_l) \cdot 10000}, \quad (2)$$

де: n - порядковий номер пробовідбору;

S - площа піка мемантину на хроматограмі випробовуваного розчину (у відповідному середовищі розчинення);

S_0 - площа піка мемантину на хроматограмі розчину порівняння (у відповідному середовищі розчинення);

m_0 - маса наважки РСЗ мемантину гідрохлориду, в міліграмах;

a - вміст мемантину гідрохлориду в одній таблетці, в міліграмах;

P - вміст основної речовини в РСЗ мемантину гідрохлориду, у відсотках;

V_n - об'єм розчинника в n -ій точці пробовідбору, в мілілітрах;

b_n - зменшення речовини при здійсненні пробовідбору, що обчислюється за формулою 3:

$$b_n = \frac{a \cdot X_{n-1} \cdot d \cdot 0,01}{V_{n-1}}, \quad (3)$$

де: d - об'єм аликвоти, в мілілітрах (10.0 мл).

Детектування сигналу мемантину гідрохлориду здійснюється шляхом реєстрації іонізованих молекул. Іонізація у приладі (детектор 6530 Accurate Mass Q-TOF) здійснюється за рахунок протонування молекул. Джерелом протонів виступає рухома фаза, до складу якої входить мурашина кислота. У разі дослідження розчинів, приготованих в середовищі 0.1 М

розчині хлористоводневої кислоти рН 1.2, виникає необхідність попередньої нейтралізації хлористоводневої кислоти перед проведенням аналізу, оскільки вона, як сильніша порівняно з мурашиною кислотою, практично повністю іонізує всі розчинені молекули речовини, що призводить до значного відхилення лінійної залежності аналітичного сигналу від концентрації

аналіту. Нейтралізацію проводять 0.1 М розчином натрію гідроксиду, який додається до проби випробовуваного розчину.

При розробці методик ВЕРХ з мас-детектором, як правило, використовують розчини мурашиної кислоти в суміші з метанолом. Для максимально швидкого виходу МГ вивчалися різні співвідношення метанол - 0.1% розчин мурашиної кислоти, емпірично встановлено їх співвідношення (55:45), що дозволяє досягти часу утримування МГ 1.7 хв та зменшити час аналізу проб при вивченні профілів розчинення у двічі порівняно з методикою [11] (це важливо, тому що для однієї серії препарату треба вводити до 50 проб). Розроблена методика також має перевагу - ізократичне елюювання.

Специфічність методу заснована на можливості достовірно визначати вміст мемантину гідрохлориду в присутності допоміжних речовин і досягається шляхом використання зовнішніх

стандартів.

На хроматограмах розчинів модельної суміші, що містять допоміжні речовини без діючої речовини (плацебо) в трьох середовищах розчинення (рисунк 2), відсутні піки, які заважають визначенню мемантину гідрохлориду, що дозволяє оцінити методику його ВЕРХ-визначення в препараті МЕМАТОН ІС, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг, як специфічну.

Підтверджено, що запропоновані умови хроматографування забезпечують селективність та достатньо короткий час хроматографування. При хроматографуванні розчину порівняння та випробовуваного розчину час утримування піка мемантину становить близько 1.7 хв (рис. 3, 4).

Типові хроматограми розчинів порівняння наведено на рисунку 3.

Типові хроматограми випробовуваних розчинів наведено на рисунку 4.

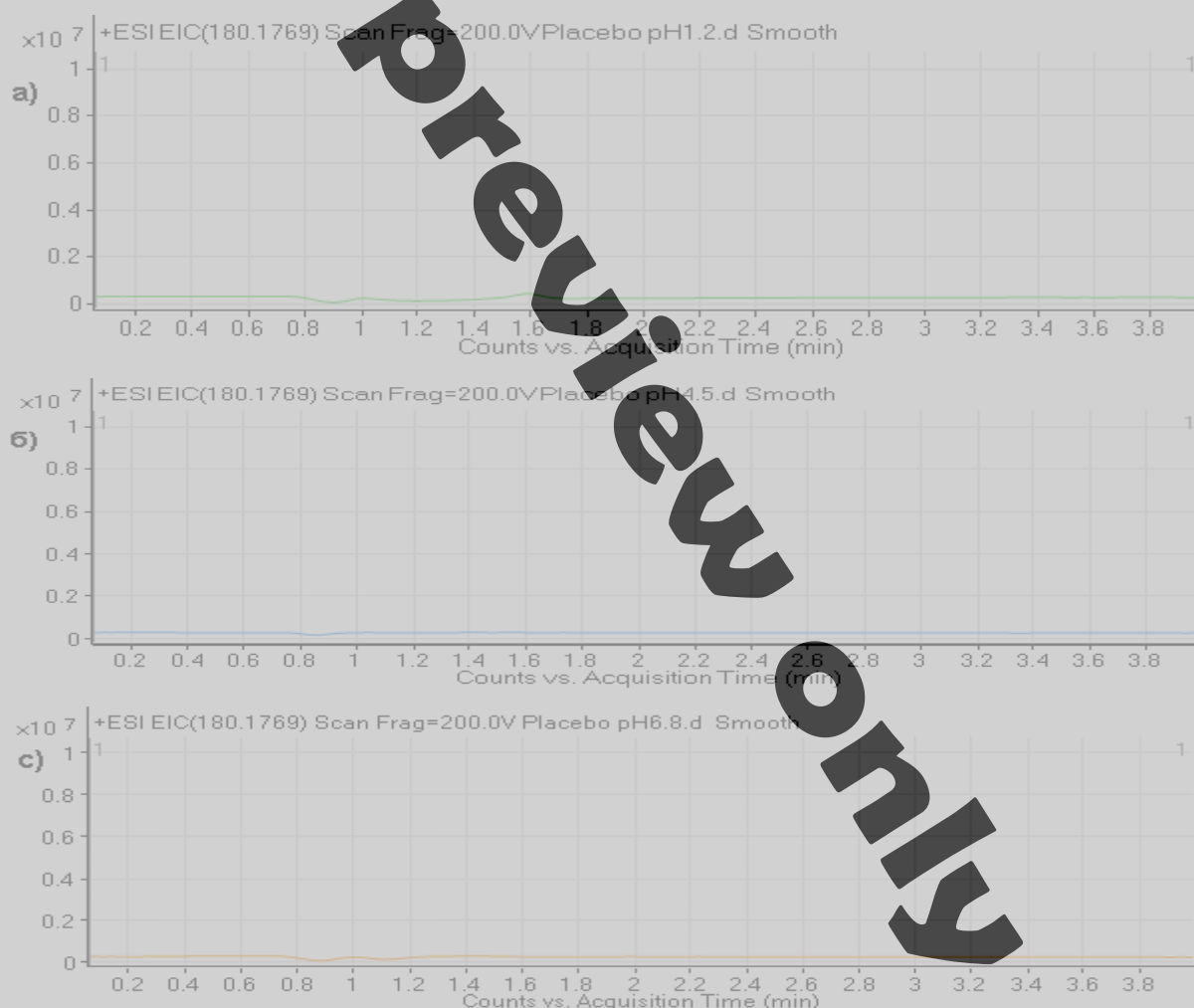


Рис.2. Хроматограми розчинів модельної суміші: а - 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2; б - ацетатний буферний розчин рН 4.5; с - фосфатний буферний розчин рН 6.8.

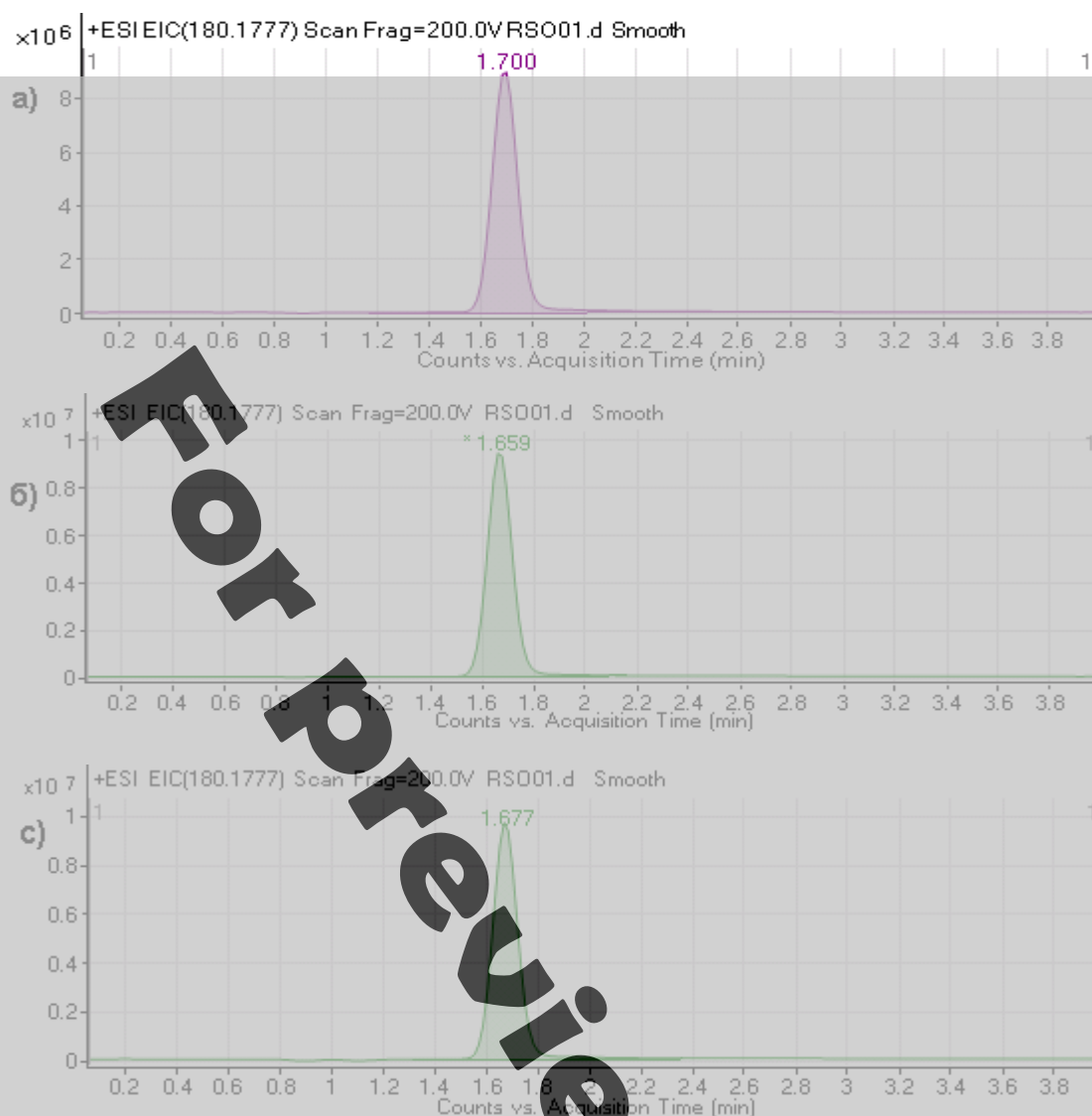


Рис. 3. Хроматограми розчинів порівняння: а - 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2; б - ацетатний буферний розчин рН 4.5; с - фосфатний буферний розчин рН 6.8.

Вивчення лінійності проводили на модельних сумішах в різних буферних розчинах в інтервалі 35 - 150 % (0.39 – 1.65 мкг/мл – для 0.1 М розчину хлористоводневої кислоти рН 1.2; 3.9 – 16.5 мкг/мл – для ацетатного буферного розчину рН 4.5; фосфатного буферного розчину рН 6.8) від нормованого вмісту мемантину гідрохлориду в

таблетці.

Метрологічні характеристики лінійної залежності площі піка мемантину від його концентрації в нормалізованих координатах відповідають вимогам прийнятності, що рекомендовані ДФУ [12], дані наведено в таблиці 1.

Таблиця 1. Метрологічні характеристики лінійності методики.

Величина	Критерії прийнятності параметрів лінійної залежності	Отримані значення середовище		
		рН 1.2	рН 4.5	рН 6.8
b^*	Близко к 1	0.9914	0.9946	0.9932
$ a ^*$	≤ 2.1	0.8633	0.5353	0.6798
R^*	≥ 0.99839	0.99966	0.99966	0.99977

* b – кутовий коефіцієнт; a – вільний член лінійної залежності (%); R – коефіцієнт кореляції.

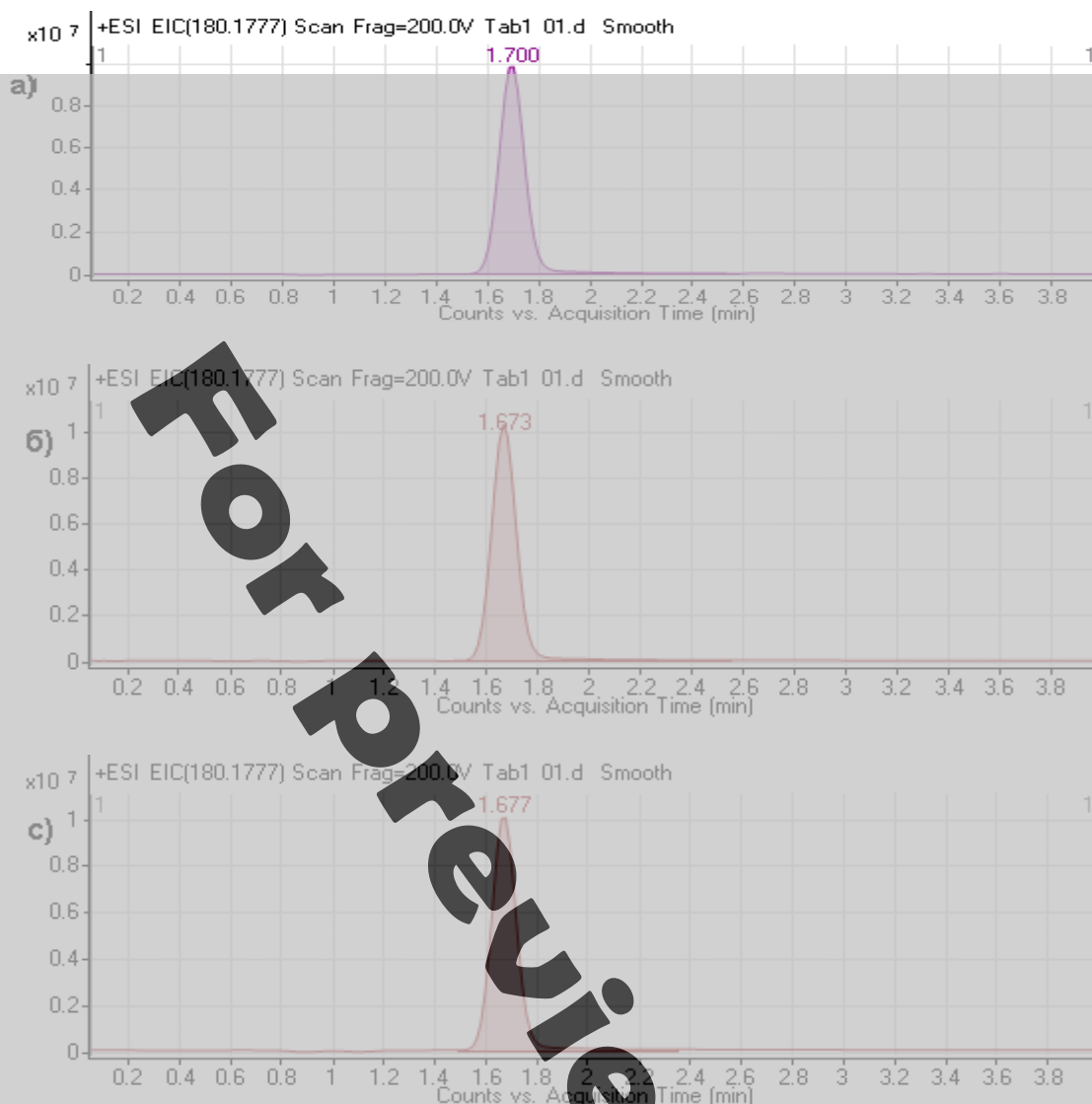


Рис. 4. Хроматограми випробовуваних розчинів: а - 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти рН 1.2; б - ацетатний буферний розчин рН 4.5; с - фосфатний буферний розчин рН 6.8.

Для оцінки збіжності готували та аналізували розчини порівняння та 6 випробовуваних розчинів із концентраціями діючої речовини на рівні 100 % вивільнення АФІ. Розчини готували з однієї серії препарату.

Згідно з [12] значення $\bar{X}$ для різних днів повинні статистично не відрізнятися, що свідчить про задовільну внутрішньолабораторну прецизійність.

Для з'ясування цього розраховують середньозважене стандартне відхилення S_0 :

$$S_0 = \sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{2}},$$

де: S_1 – стандартне відхилення результатів першого дня; S_2 – стандартне відхилення результатів другого дня; 2 – кількість днів вимірювань.

Модуль різниці між середніми значеннями $\bar{X}$ для різних днів повинен задовольняти співвідношенню:

$$|\bar{X}_1 - \bar{X}_2| \leq \sqrt{2} \cdot t(0,95; f) \cdot \frac{S_0}{\sqrt{n}},$$

де: $f = 2(n-1)$; n – число паралельних вимірювань.

Результати перевірки внутрішньолабораторної прецизійності представлені в таблиці 2 (зроблені в різні дні одним аналітиком).

Наведені розрахунки свідчать про задовільну внутрішньолабораторну прецизійність.

Правильність визначали в трьох середовищах розчинення в межах діапазону використання аналітичної методики із застосуванням методу «введено-знайдено» на модельних розчинах (згідно з підходом ДФУ досліджували правильність на трьох рівнях концентрації, по три точки на кожному рівні, це 9 наважок, тобто 9 незалежних результатів). Отримані результати наведено в таблиці 3.

Таблиця 2. Результати перевірки внутрішньолaborаторної прецизійності.

День	Знайдений вміст МГ, %			
	№ зразка	середовище		
		pH 1.2	pH 4.5	pH 6.8
Перший	1	101.56	99.84	99.33
	2	100.01	100.93	98.82
	3	99.17	100.24	97.97
	4	98.84	99.53	99.64
	5	98.94	99.26	101.34
	6	97.97	99.97	100.02
	Середнє значення	99.42	99.96	99.52
Другий	1	101.19	100.66	99.54
	2	102.40	99.20	101.20
	3	100.17	100.45	100.26
	4	99.44	100.40	100.27
	5	99.06	99.58	98.97
	6	100.50	99.00	101.13
	Середнє значення	100.46	99.88	100.23
	S_0	1.23	0.65	1.01
$ \bar{X}_1 - \bar{X}_2 \leq \sqrt{2} \cdot t(0.95; f) \cdot \frac{S_0}{\sqrt{n}}$		1.04 < 1.58	0.08 < 0.84	0.71 < 1.30

Таблиця 3. Результати вивчення правильності.

X _i , %	Концентрація МГ					
	Y _i , %			Z _i , %		
	середовище			середовище		
	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.8	pH 1.2	pH 4.5	pH 6.8
50	51.10	50.60	50.70	101.19	100.40	100.20
50	50.60	51.30	49.90	99.80	101.79	99.60
50	50.50	50.10	50.80	99.80	99.40	100.79
100	99.90	100.60	100.20	99.01	100.10	99.50
100	99.80	98.00	101.60	99.11	97.71	100.79
100	100.90	99.40	101.40	100.10	99.00	100.60
150	149.90	149.60	151.10	99.47	99.60	100.27
150	151.20	151.70	148.60	100.27	100.73	99.07
150	150.90	152.20	149.60	100.07	101.20	99.47
	Середнє Z _i , %			99.87	99.99	100.03
	SD _Z , %			0.66	1.23	0.64
	Критерій $\delta\% \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}}$			0.13 ≤ 0.41	0.01 ≤ 0.76	0.03 ≤ 0.40
	Висновок			Відповідає	Відповідає	Відповідає

Як видно з приведених розрахунків вимоги до статистичної незначущості систематичної похибки виконуються для усіх середовищ розчинення. Таким чином, правильність методики задовольняє необхідним вимогам.

Надійність хроматографічної процедури підтверджували вивченням робастності. Надійність хроматографічної процедури перевіряли за варіабельністю температури термостату колонки (30 °C, 35 °C, 40 °C), швидкості потоку рухомої фази

(0.95 мл/хв, 1.00 мл/хв, 1.05 мл/хв), складу рухомої фази (метанол - 0.1% (об/об) водний розчин мурашиної кислоти (54:46), (55:45), (56:44)), та застосуванням альтернативної хроматографічної колонки. Відповідно до цього виконували хроматографування розчинів порівняння.

Варіабельність площ піків мемантину для кожної із умов порівняно з початковими умовами становить не більше 2.0%. Таким чином, аналітичну методику можна вважати робасною.

Стабільність розчину порівняння
Для підтвердження терміну придатності розчинів порівняння вивчена залежність площ піків мемантину гідрохлориду від часу в інтервалі 0, 2, 4, 6 і 24 години. Розчини зберігалися при кімнатній температурі. Дані представлені в таблиці 4.

Підтверджено стабільність випробовуваних розчинів та розчинів порівняння у разі їх зберігання за кімнатної температури протягом 24 год.

Профілі розчинення препаратів мемантину гідрохлориду наведені на рисунку 5.

Таблиця 4. Результати визначення стабільності розчинів порівняння МГ.

Середовища розчинення	Час проведення вимірювання, год	Площа піка	$\bar{S}$	RSD, %
pH 1.2	0	63032486.84	62723347.51	0.47
	2	62553771.12		
	4	63054628.72		
	6	62504289.04		
	24	62471561.81		
pH 4.5	0	62035774.91	61942660.23	0.13
	2	61881267.71		
	4	61987631.64		
	6	61843314.06		
	24	61965312.82		
pH 6.8	0	62900897.03	62776098.03	0.28
	2	62938328.24		
	4	62541491.47		
	6	62640684.13		
	24	62859089.27		

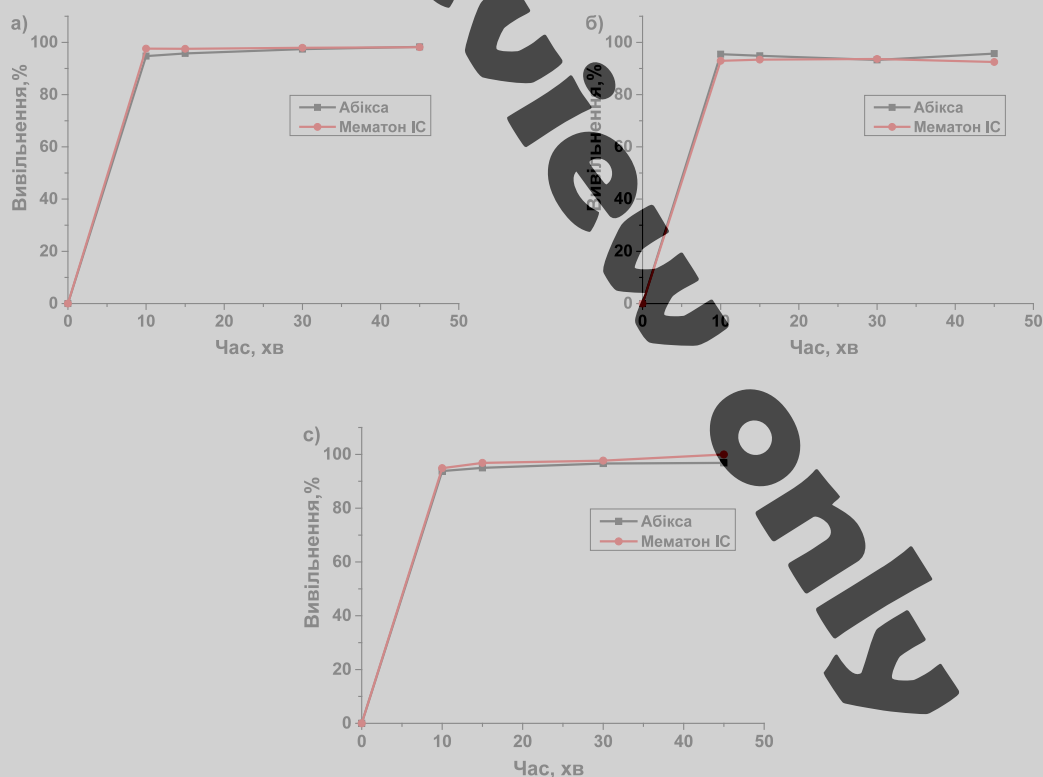


Рис.5. Криві профілів розчинення мемантину гідрохлориду для двох досліджуваних серій препарату: а - 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти pH 1.2; б - ацетатний буферний розчин pH 4.5; с - фосфатний буферний розчин pH 6.8 (n=12).

Прецизійність результатів кількісного визначення мемантину гідрохлориду при вивченні профілів розчинення препарату MEMATON IC для кожного часового проміжку відбору проб наведено в таблиці 5.

Таблиця 5. Прецизійність результатів кількісного визначення МГ для кожного часового проміжку відбору проб.

Час, хв	Отримані значення RSD, % (n=12)		
	рН 1.2	середовище рН 4.5	рН 6.8
10	2.53	2.40	1.50
15	2.26	1.44	0.97
30	1.81	1.77	0.59
45	0.53	1.00	0.56

Результати дослідження профілів розчинення підтверджують ідентичність профілів розчинення

Література

1. O.V. Burmaka. Rozrobka ta validatsiia metodyky vyznachennia enisamiumu yodydu dlia vyvchennia profiliv rozchynennia protyvirusnoho zasobu. *Farmatsevtichnyi zhurnal*. 2018, 3-4, 38 – 46. DOI: 10.32352/0367-3057.3-4.18.06
2. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research. Guidance for industry: Waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate-release solid oral dosage forms based on a Biopharmaceutics Classification System. 2017. www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance.
3. Medina J. R., Salazar D. K., Hurtado M., Cortes A. R., Dominguez-Ramirez A. M. Comparative *in vitro* dissolution study of carbamazepine immediate-release products using the USP paddles method and the flow-through cell system. *Saudi Pharm. J.* 2014, 22, 141 - 147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.02.001>
4. Hassouna M.E.M., Issa Y.M., Zayed A.G. A comparative study of the *in-vitro* dissolution profiles of paracetamol and caffeine combination in different formulations using HPLC. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012, 02 (05), 52 - 59. DOI: 10.7324/JAPS.2012.2531
5. Shamal L.L., Shohin I.E., Yarushok T.A., Savchenko A.Yu. Test sravnitel'noy kinetiki rastvoreniya dlya strategicheskoi znachimogo protivopuholevogo lekarstvennogo sredstva – temozolomida. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv*. 2013, 2 (3), 54 -59.
6. Vasilenko G.F., Ramenskaya G.V., Shohin I.E., Malashenko E.A. Otsenka vozmozhnosti zameny issledovaniy bioekvivalentnosti *in vivo* na izuchenie sravnitel'noy kinetiki ekvivalentnosti *in vitro* (protsedura

препаратів АБІКСА, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг (с. 370393) та MEMATON IC, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг (с. 441116). Вивільнення більше 85% мемантину гідрохлориду за 15 хв у всіх середовищах розчинення говорить про подібність профілів розчинення і не вимагає розрахунку фактора подібності f_2 .

Висновки

За результатами валідації встановлено, що наведена методика є специфічною, характеризується коректною точністю, правильністю, лінійною залежністю в вивченому діапазоні концентрацій, робастністю, що дозволяє використовувати її для вивчення профілів розчинення лікарського препарату MEMATON IC, таблетки, вкриті плівковою оболонкою, по 10 мг.

Результати дослідження профілів розчинення підтверджують ідентичність профілів розчинення препарату MEMATON IC та референтного препарату АБІКСА.

«Bioveyver») pri opredelenii vzaimozamenyaemosti lekarstvennykh sredstv («Dzhenerikov»). *Himiko-farm. Zhurnal*. 2011, 2, 46 – 52.

7. Guidance on the Investigation of Bioequivalence. European Medicines Agency (EMA). Committee for Medicinal Products of Human Use (CHMP). 2010.

8. The Memantine Hydrochloride Tablets. Revision Bulletin official on April 1, 2016 (USP 40–NF 35).

9. Narola B., Singh A.S., Santhakumar P.R., Chandrashekar T.G. Validated stability-indicating reverse phase HPLC assay method for the determination of memantine hydrochloride drug substance with UV-detection using precolumn derivatization technique. *Anal.Chem. Ins.* 2010, 5, 37–45.

10. Rio-Sancho S., Serna-Jiménez C.E., Calatayud-Pascual M.A., Balaguer-Fernández C., Femenía-Font A., Merino V., López-Castellano A. High-performance liquid chromatographic ultraviolet determination of memantine hydrochloride after *in vitro* transdermal diffusion studies. *J. Chem.* 2013, Article ID 502652, 7 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/502652>

11. Koeberle M.J., Hughes P.M., Wilson C.G., Skellern G.G. Development of a liquid chromatography–mass spectrometric method for measuring the binding of memantine to different melanins. *J. Chromatogr. B*. 2003, 787(2), 313–322. doi:10.1016/s1570-0232(02)00957-1

12. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy: v 3 t. / Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv». – 2-e vyd. – T. 1. – Kharkiv: Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2015, 1128 s.