

УДК 615.213:54.062:543.422.3

3.4.1 Промышленная фармация и технология получения лекарств

DOI: 10.37903/vsgma.2022.4.27 EDN: TBOIYB

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРЕГАБАЛИНА МЕТОДОМ ФОТОМЕТРИИ
© Люст Е.Н., Ендальцева О.С.*Пермская государственная фармацевтическая академия, Россия, 614990, Пермь, ул. Полевая, 2**Резюме***Цель.** Разработка методики определения прегабалина методом фотометрии.**Методика.** Авторами разработана методика фотометрического определения производного гамма-аминомасляной кислоты – прегабалина, проведено валидирование методики.**Результаты.** Выбраны условия образования ионного ассоциата: кислотный краситель (бромтимолового синего раствор), pH среды (7,0), соотношение реагента и определяемого вещества, также получены спектральные характеристики ассоциата, аналитические длины волн (282, 416 нм). В ходе валидации методики получены удовлетворительные результаты. Проведено доказательство хроматографическим методом (метод хроматографии в тонком слое) образования ионного ассоциата прегабалина с кислотным красителем.**Заключение.** Предложены условия анализирования прегабалина фотометрическим методом, методика пригодна для идентификации и количественного определения вещества.**Ключевые слова.** Прегабалин, фотометрия, оптическая плотность, ионный ассоциат, кислотный краситель**DEVELOPMENT OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF PREGABALIN BY PHOTOMETRY**
Lust E.N., Endaltseva O.S.*Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaja St., 614990, Perm, Russia**Abstract***Objective.** Development of a method for determining pregabalin by photometry.**Methods.** The authors developed a method for the photometric determination of a derivative of gamma-aminobutyric acid, pregabalin, and validated the method.**Results.** The conditions for the formation of an ion associate were chosen: an acid dye (bromothymol blue solution), pH of the medium (7.0), the ratio of the reagent and analyte, and the spectral characteristics of the associate, analytical wavelengths (282, 416 nm) were also obtained. During the validation of the methodology, satisfactory results were obtained. The chromatographic method (thin layer chromatography method) proved the formation of an ion associate of pregabalin with an acid dye.**Conclusions.** The conditions for the analysis of pregabalin by the photometric method are proposed, the technique is suitable for the identification and quantitative determination of the substance.**Keywords:** Pregabalin, photometry, optical density, ion associate, acid dye**Введение**

В настоящее время проблема злоупотребления лекарственными препаратами (ЛП) с немедицинской целью является актуальной. Это различные фармакологически активные вещества, способные вызывать чувство «эйфории», уменьшать абстинентный синдром, устранять синдром «отмены».

Прегабалин – аналог гамма-аминомасляной кислоты ((S)-3-(аминометил)-5-метилгексановая кислота), обладает противосудорожным, анальгезирующим и анксиолитическим эффектами [1, 4,

19]. В литературе встречается описание случаев злоупотребления, а также формирования зависимости от прегабалина, которые включают в себя все диагностические критерии зависимости такие как: сильное желание приёма вещества, неконтролируемый приём, состояние отмены, повышение толерантности к эффектам вещества, употребление вещества, несмотря на явные признаки вредного воздействия [14, 16-18]. В связи с этим существует потребность в разработке методик его определения.

Прегабалин проявляет амфотерные свойства, так как имеет кислотный (HOOC-) и основной (-NH₂) центры, вещество не имеет определённой спектральной поглотительной способности, что можно связать с его алифатической природой и отсутствием хромофорных группировок, которые обуславливают интенсивное поглощение света. В связи с этим, чаще всего прегабалин переводят в соединения, обладающие определёнными свойствами для более удобного детектирования или фотометрирования. В библиографических источниках встречается информация о методах определения прегабалина, таких как высокоэффективная жидкостная хроматография, газожидкостная хроматография с различными вариантами детектирования, тонкослойная хроматография и спектрофотометрия [2, 9-13, 15, 17, 20-27].

Некоторыми авторами предложено для определения азотсодержащих веществ основного характера в протонированном состоянии получение ионных ассоциатов с анионами кислотных красителей, тем самым возможно увеличение сродства образованных ассоциатов к неполярным растворителям, что может быть использовано не только для определения веществ, но и для их экстракции из объектов (вариант экстракционной фотометрии) [6]. Хотя существует и указание, что некоторые ионные ассоциаты могут образовываться, но не изолироваться неполярными растворителями [7].

Метод спектрофотометрии в УФ и видимой области в настоящий момент остается востребованным для анализа новых биологически активных соединений, лекарственных средств, растительного сырья, токсикантов [3, 5, 8].

Таким образом, целью нашего исследования является разработка методики определения прегабалина методом фотометрии с перспективой использования в фармацевтическом и химико-токсикологическом анализе.

Методика

Объект исследования: субстанция прегабалина (белый кристаллический порошок). Готовили раствор стандартного образца с концентрацией 1,5 мг/мл путем растворения в воде очищенной. Приборы, материалы: двухлучевой сканирующий спектрофотометр UV-1800 («Shimadzu», Япония), обработка данных от персонального компьютера в программе «UVProbe». Пластинки «Sorbfil» ПТСХ–П–В–УФ, стеклянные камеры для хроматографирования, облучатель УФ-254/366. Реагенты: метилового оранжевого раствор 0,01 моль/л, бромтимолового синего раствор спиртовой 0,0001 моль/л (БТС), фосфатный буферный раствор рН 7,0, ацетатный буферный раствор рН 4,5, фосфатный буферный раствор рН 9,0, хлороформ, метанол, н-бутанол, уксусная кислота ледяная, вода очищенная.

Первоначально исследования вели с несколькими кислотными красителями: растворами метилового оранжевого и бромтимолового синего. Однако было обнаружено, что в реакции взаимодействия прегабалина с метиловым оранжевым не отмечается количественной зависимости. С раствором бромтимолового синего наблюдали более стабильные результаты, регистрировали закономерность от концентрации прегабалина в растворе, поэтому дальнейшие исследования вели с данным красителем. Оптимальной величиной рН для образования ионного ассоциата является значение 7,0.

При экстракции образованного ассоциата органическим растворителем (хлороформ) установлено, что он преимущественного остается в водном слое и не переходит в органическую фракцию. Этот момент не противоречит литературным данным [7]. Напротив, БТС достаточно удовлетворительно растворяется в неполярном растворителе. В данном случае вариант экстракционно-фотометрического определения прегабалина по взаимодействию с БТС не представляется возможным. Поэтому стадия экстрагирования хлороформом рассматривается нами как стадия очистки от избытка кислотного красителя, не вступившего во взаимодействие с прегабалином.

Точное отмеренное количество прегабалина раствора помещали в коническую колбу на 50 мл, прибавляли 2 мл бромтимолового синего раствора, 2 мл фосфатного буферного раствора рН 7,0,

доводили водой до 10 мл. Перемешивали раствор не менее 1 мин. Далее проводили экстракцию 3 мл хлороформа путем встряхивания 5 мин. на шейкере при 150 об/мин. Отделяли хлороформный слой в делительной воронке. Водный слой переносили в мерную колбу на 10 мл, доводили водой очищенной до метки, перемешивали. Проводили спектральное исследование полученного водного раствора в диапазоне 240-440 нм.

Результаты исследования и их обсуждение

Снимали спектр поглощения ионного ассоциата прегабалина с БТС в диапазоне длин волн 240-440 нм. В полученных спектрах наблюдаются 3 интенсивных области поглощения с максимумами 282, 316 и 416 (рис. 1). В ходе эксперимента было установлено, что при увеличении концентрации прегабалина в водном слое, оптическая плотность увеличивалась в водном слое и уменьшалась в органическом, таким образом зависимость оптической плотности от концентрации прегабалина в хлороформном слое обратная, а в водном слое – прямая (рис. 2, 3). Таким образом, ассоциат между прегабалином и красителем образуется, но остается в водном слое.

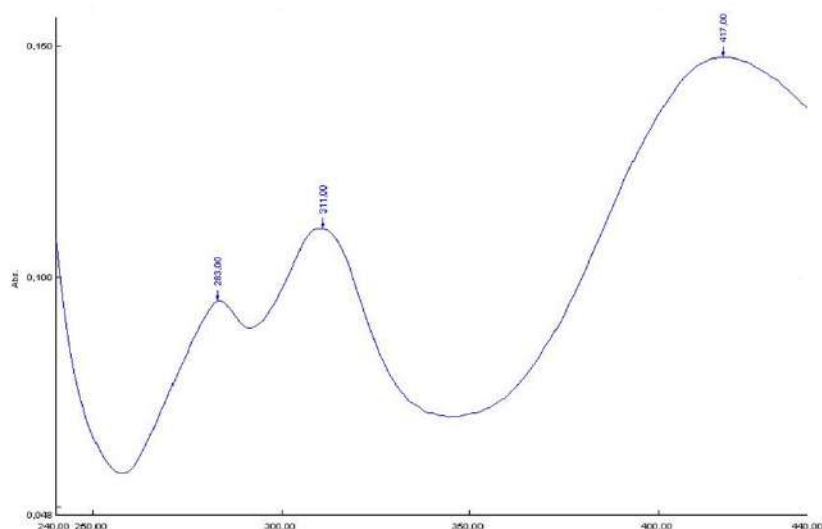


Рис. 1. Спектр поглощения ионного ассоциата прегабалина с бромтимоловым синим

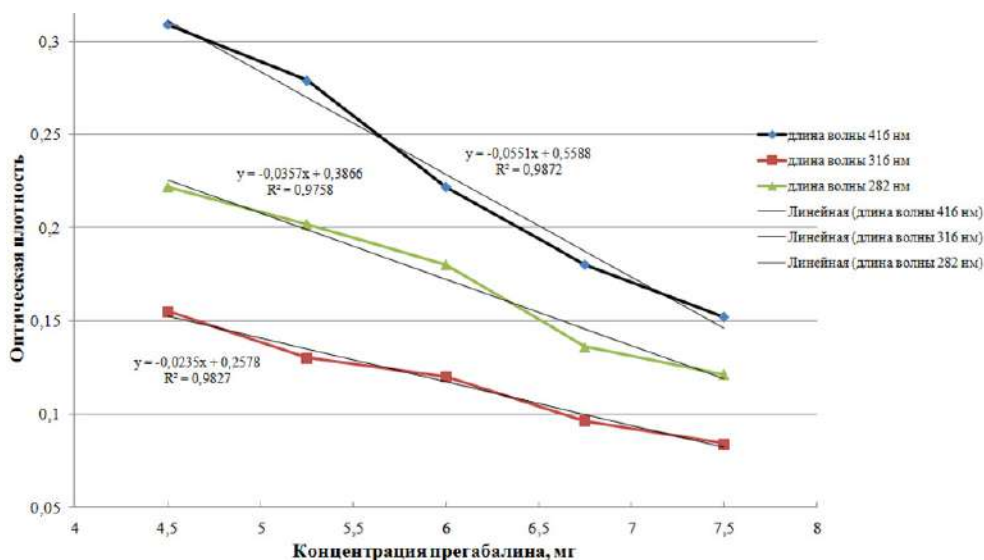


Рис. 2. Зависимость оптической плотности (в хлороформном слое) от концентрации прегабалина в водном слое

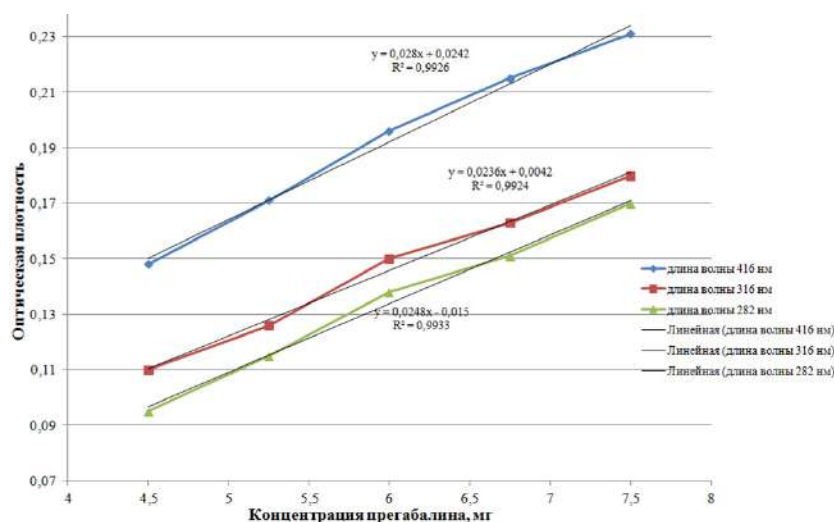


Рис. 3. Зависимость оптической плотности (в водном слое) от концентрации прегабалина в водном слое

Полученные результаты были подтверждены методом хроматографии в тонком слое (ТСХ), которая позволяет разделить многокомпонентные смеси (рис. 4). Нами проанализированы водные и органические фракции на ТСХ-пластинках в системах растворителей: хлороформ-метанол-вода (9:4,5:1), н-бутанол-уксусная кислота-вода (8:2:4); детектирование осуществляли, просматривая пластины в УФ-свете. На пластинках обнаруживали: водная фракция: зона локализации сине-фиолетового цвета (ассоциат прегабалина с БТС); органическая фракция: зоны локализации желтого цвета (БТС).

Параллельно на этих же пластинках анализировали холостые пробы, полученные по методике, но без добавления прегабалина: водная фракция и органическая фракция. Обеим фракциям на пластинках соответствуют зоны абсорбции желтого цвета, принадлежащие БТС. Таким образом, нами подтверждено, что ионный ассоциат прегабалина с кислотным красителем образуется, но остается в водном слое.

Методика разрабатывалась, в том числе, и для количественного определения прегабалина. В полученных спектрах ионного ассоциата (водный слой) наблюдается три интенсивных области поглощения, но для длины волны 316 нм получен наименьший коэффициент корреляции ($R^2 = 0,9924$), поэтому для аналитических целей можно рекомендовать длины волн 282 нм ($R^2 = 0,9933$) и 416 нм ($R^2 = 0,9926$) (рис. 3).

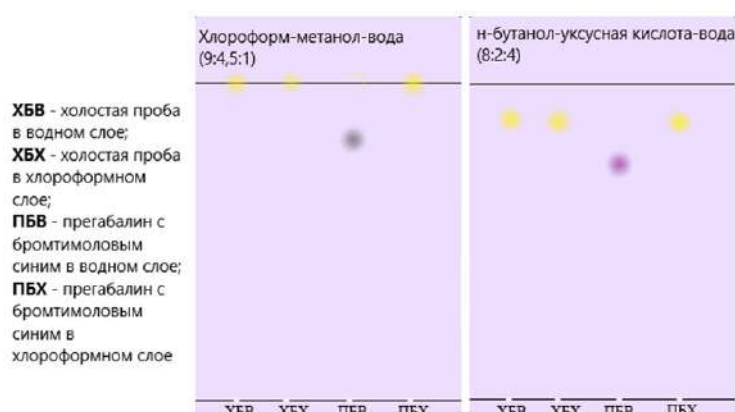


Рис. 4. Результаты исследований методом хроматографии в тонком слое

Разработанные условия валидированы по необходимым характеристикам, измерения вели при длине волны 282 нм. Установлено, что методика отличается специфичностью; линейностью в пределах аналитической области (80-120 %): полученная зависимость описывается уравнением:

$$A = 0,0248x - 0,015$$

где x – концентрация прегабалина в растворе (мг), а коэффициент корреляции (R^2) равен 0,9933; правильностью путем анализа модельных смесей с известной концентрацией вещества (процент восстановления – от 98,6 до 102,8%, среднее 100,2%); сходимостью путем анализа независимых результатов, полученным в одинаковых условиях ($P = 95\%$, коэффициент вариации – 0,63%, относительная средняя ошибка определения – 0,66 %).

Выводы

1. Выбраны оптимальные условия для обнаружения прегабалина методом фотометрии: кислотный краситель – бромтимоловый синий, рН 7,0, аналитическая длина волны 282 нм или 416 нм.
2. Проведено хроматографическое доказательство образования ионного ассоциата прегабалина с кислотным красителем. Разработанная методика определения прегабалина может быть применена для фармацевтических целей и химико-токсикологического анализа.

Литература (refereses)

1. Амелин А.В. Прегабалин при лечении спондилогенной радикулопатии // Русский медицинский журнал. – 2013 – Т.21, №10. – С. 480-481. [Amelin, A.V. *Russkij medicinskij zhurnal*. Russian medical journal. – 2013 – V.21, №10. – P. 480-481. (in Russian)]
2. Артемьева И.А., Мингазов А.А., Мусина Л.С., Набиуллин И.И. Обнаружение производных гамма-аминомасляной кислоты в практике судебно-химического отделения // Материалы конференции «Актуальные вопросы судебной медицины и права». – Казань, 2022. – Вып. 3. – С. 170-176. [Artem'eva I.A., Mingazov A.A., Musina L.S., Nabiullin I.I. *Materialy konferencii «Aktual'nye voprosy sudebnoj mediciny i prava»*. Materials of the Conference «Current issues of forensic medicine and law». – Kazan, 2022. – Rel. 3. – P. 170-176. (in Russian)]
3. Глушенко С.Н., Куркин В.А., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н. Разработка методики количественного определения антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного (*Aloe Arborescens* L.) // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020 – Т.19, №3. – С. 214-219. [Glushhenko S.N., Kurkin V.A., Shmygareva A.A., San'kov A.N. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2020 – V.19, №3. – С. 214-219. (in Russian)]
4. Государственный реестр лекарственных средств. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx>. [Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv. State Register of Medicines. URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/Default.aspx> (in Russian)]
5. Замараева А.И., Бессонова Н.С., Кобелева Т.А., Сичко А.И. Количественный анализ и стабильность новой лекарственной формы «метронидазол» // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2020. – Т.19, №2. – С.155-162. [Zamaraeva A.I., Bessonova N.S., Kobeleva T.A., Sichko A.I. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2020. – Т.19, №2. – С.155-162. (in Russian)]
6. Карташов В.А., Чернова Л.В. Химико-токсикологический анализ: выделение токсических веществ из биологических объектов. – Майкоп: Качество, 2008. – Ч. 1. – С. 113-116. [Kartashov V.A., Chernova L.V. *Himiko-toksikologicheskij analiz: vydelenie toksicheskikh veshchestv iz biologicheskikh ob'ektov*. Chemical-toxicological analysis: isolation of toxic substances from biological objects. – Maykop: Quality, 2008. – Part 1. – P. 113-116. (in Russian)]
7. Коренман И.М. Экстракция органических веществ – 1970. – С. 26-28. [Korenman I.M. *Ekstrakciya organicheskikh veshchestv*. Extraction of organic substances. – 1970. – P. 26-28. (in Russian)]
8. Кукурека А.В., Сипливая Л.Е., Шорманов В.К., Бесходарная М.И. Разработка спектрофотометрического метода анализа меропенема // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2022. – Т.21, №1. – С. 160-166. [Kukureka A.V., Siplivaja L.E., Shormanov V.K., Beshodarnaja M.I. *Vestnik Smolenskoj gosudarstvennoj medicinskoj akademii*. Bulletin of the Smolensk State Medical Academy. – 2022. – V.21, №1. – P. 160-166. (in Russian)]
9. Люст Е.Н., Ендальцева О.С., Голубев Р.С. Разработка методики определения прегабалина спектральным методом // Биофармацевтический журнал. – 2018. – Т.10, № 2. – С. 42-45. [Lyust E.N., Endal'ceva O.S., Golubev R.S. *Biofarmaceuticheskij zhurnal*. Biopharmaceutical Journal – 2018. – V.10, №2. – P. 42-45. (in Russian)]

10. Люст Е.Н., Ендальцева О.С., Петухова Н.Н. Разработка методики определения прегабалина методом газожидкостной хроматографии // Дальневосточный медицинский журнал. – 2019. – №3. – С. 54-56. [Lyust E.N., Endal'tseva O.S., Petuhova N.N. *Dal'nevostochnyj medicinskij zhurnal*. Far Eastern Medical Journal – 2019. – №3. – P. 54-56. (in Russian)]
11. Люст Е.Н., Зурики Х., Абул З. К разработке методик идентификации прегабалина // Международный научный журнал: Инновационная наука. – 2022. – №5-1. – С. 111-113. [Ljust E.N., Zuriki H., Abul Z. *Mezhdunarodnyj nauchnyj zhurnal: Innovacionnaya nauka*. International Scientific Journal: Innovative Science. – 2022. – № 5-1. – P. 111-113. (in Russian)]
12. Люст Е.Н., Хохлова Е.В. Определение прегабалина с 5-диметиламинафталин-1-сульфонилхлоридом (дансилхлорид) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Материалы конференции «Становление и развитие новой парадигмы инновационной науки в условиях современного общества». – Саратов, 2018. – С. 197-202. [Lyust E.N., Hohlova E.V. *Materialy konferencii «Stanovlenie i razvitie novoj paradigmy innovacionnoj nauki v usloviyah sovremennogo obshchestva»*. Materials of the Conference «Formation and development of a new paradigm of innovative science in the conditions of modern society». – Saratov, 2018. – P. 197-202. (in Russian)]
13. Люст Е.Н., Хохлова Е.В. Разработка методики определения прегабалина методом высокоэффективной жидкостной хроматографии // Международный школьный научный вестник. – 2018. – №5, ч.4. – С. 685-694. [Lyust E.N., Hohlova E.V. *Mezhdunarodnyj shkol'nyj nauchnyj vestnik*. International School Science Bulletin – 2018. – №5, p. 4. – P. 685-694. (in Russian)]
14. Международная классификация болезней 10-го пересмотра. URL: <https://mkb-10.com/index.php?pid=4048>. [Mezhdunarodnaya klassifikaciya boleznej 10-go peresmotra. International classification of diseases 10th revision. URL: <https://mkb-10.com/index.php?pid=4048> (in Russian)]
15. Орлова А.М., Калёкин Р.А., Павлова А.З. К вопросу изучения спектрофотометрией прегабалина для целей и задач судебно-химического и химико-токсикологического исследования // Материалы конференции «Проблемы злоупотребления лекарственными препаратами и новыми психоактивными веществами». – Пермь, 2019. – С. 33-36. [Orlova A.M., Kalyokin R.A., Pavlova A.Z. *Materialy konferencii «Problemy zloupotrebleniya lekarstvennyimi preparatami i novymi psihoaktivnymi veshchestvami»*. Materials of the Conference «Problems of abuse of drugs and new psychoactive substances». – Perm, 2019. – P. 33-36. (in Russian)]
16. Пискунов М.В., Кривенков А.Н., Сорокина Н.Ю. Случай зависимости от лекарственного препарата прегабалин («Лирика») // Наркология. – 2012 – №6. – С. 64-69. [Piskunov M.V., Krivenkov A.N., Sorokina N.YU. *Narkologiya*. Narcology. – 2012 – №6. – P. 64-69. (in Russian)]
17. Правдюк М.Ф. Проблемы анализа и немедицинского использования «Лирики» в РСО-АЛАНИЯ // Сборник тезисов конференции АСТЕ'2013. – Москва, 2013. – С. 80. [Pravdyuk, M.F. *Sbornik tezisov konferencii ASTE'2013*. Collection of abstracts of the ASTE'2013 conference. – Moscow, 2013. – P. 80. (in Russian)]
18. Рохлина М.Л., Ненастьева А.Ю., Усманова Н.Н., Захаров Е.Д., Демурова В.Н. Злоупотребление прегабалином (Лирикой) // Вопросы наркологии – 2015. – №3. – С.9-15. [Rohlina M.L., Nenast'eva A.Ju., Usmanova N.N., Zaharov E.D., Demurova V.N. *Voprosy narkologii*. Questions of narcology. – 2015 – №3. – P.9-15. (in Russian)]
19. Справочник лекарственных средств. URL: https://www.vidal.ru/drugs/pregabalin-richter_38683. [Spravochnik lekarstvennyh sredstv. Directory of medicines. URL: https://www.vidal.ru/drugs/pregabalin-richter_38683 (in Russian)]
20. Ahmadkhanhi R., Mottaghi S., Zargarpoor M., Souri E. Validated HPLC Method for Quantification of Pregabalin in Human Plasma Using 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene as Derivatization Agent // Chromatography Research International. – 2014. – 6 p.
21. Berry D., Millington C. Fnalysis of pregabalin at concentrations in human plasma/serum by reversed-phase HPLC // Ther Drug Monit. – 2005. – V.27 (4). – P. 451-456.
22. Moffat A.C., Osselton M.D., Widdop B. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. – London: Pharmaceutical Press, 2011. – P. 1951.
23. Rajinder Singh Gujral, Sk Manirul Haque, Prem Shanker Sensitive Spectrophotometric Method for the Determination of Pregabalin in Bulk, Pharmaceutical Formulations and in Human Urine Samples // International journal of Biomedical science. – 2009 – N!5 (4). – P. 421-427.
24. Sherin F. Hammad, Ola M. Abdallah Optimized and Validated Spectrofotometric Methods for the Determination of Pregabalin in Pharmaceutical Formulation Using Ascorbic Acid and Salicylaldehyde // Journal of American Science – 2012. – N18 (12). – P. 118-124.
25. Thejaswini J.C., Gurupadayya B.M., Raja P. Gas Chromatographic Determination of Pregabalin in Human Plasma using Ethyl Chloroformate Derivatizing Reagent // Journal of Pharmacy Research, 2012. – V.5, Is.6. – P. 3112-3115.

26. Vermeij T.A., Edelbroek P.M. Simultaneous high-performance liquid chromatographic analysis of pregabalin, gabapentin and vigabatrin in human serum by precolumn derivatization with o-phthalaldehyde and fluorescence detection // *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. – 2004. – P. 297-303.
27. Walsh Mohamed I., Fathallah F Belal, Nahed M El-Enany, Mahmoud H El-Maghrabey Utility of certain nucleophilic aromatic substitution reactions for the assay of pregabalin in capsules // *Chemistry Central Journal*. – 2011. – V.5, Is.1. – P. 36-46.

Информация об авторах

Люст Елена Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент, доцент кафедры токсикологической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: elenalyust@mail.ru

Ендальцева Ольга Сергеевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России. E-mail: 260578@mail.ru

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.