

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. Каразіна
Кафедра прикладної хімії

УДК 543.544.943.3:54.061:615.213

До захисту допускаю

_____ Завідувач кафедри
«__» _____ 2025 р. д.х.н., проф. Чебанов В.А.

**ІДЕНТИФІКАЦІЯ ПРЕГАБАЛІНУ
МЕТОДОМ МІЦЕЛЯРНОЇ ТОНКОШАРОВОЇ ХРОМАТОГРАФІЇ**

Кваліфікаційна робота магістра
II курсу хімічного факультету
СМАГЛІЯ ЯРОСЛАВА ОЛЕГОВИЧА

Науковий керівник
Старший викладач

Єфімов П.В.

ХАРКІВ 2025

РЕФЕРАТ

Кваліфікаційна робота містить 44 сторінки, 2 розділи, 15 рисунків, 4 таблиці, використано 37 літературних джерел.

У межах дипломної роботи здійснено дослідження застосування міцелярної тонкошарової хроматографії (МТШХ) з метою ідентифікації прегабаліну — активної фармацевтичної субстанції, що характеризується протисудомним і знеболювальним ефектом.

Розкрито механізми утворення рухомих фаз за участю поверхнево-активних речовин, а також проаналізовано специфіку їх взаємодії з аналізованою речовиною та сорбційним матеріалом.

Проведено експериментальну частину з використанням варіативних складів рухомих фаз, до яких входили цетилпіридинію хлорид, Tween 80 та комбінації з додаванням 1-пропанолу.

Отримані результати підтверджують ефективність методичного підходу та засвідчують можливість його впровадження у фармацевтичну лабораторну практику для контролю якості лікарських засобів.

Ключові слова: МІЦЕЛЯРНА ТОНКОШАРОВА ХРОМАТОГРАФІЯ, ПРЕГАБАЛІН, МЕТОДИ АНАЛІТИЧНОГО КОНТРОЛЮ, ЦЕТИЛПІРИДИНІЮ ХЛОРИД, TWEEN 80.

ABSTRACT

The master's thesis contains 44 pages, 2 sections, 15 figures, 4 tables, 37 literary sources were used.

A study on the use of micellar thin-layer chromatography (MTLC) for the identification of pregabalin, an active pharmaceutical substance characterized by anticonvulsant and analgesic action, was carried out

The mechanisms of formation of mobile phases with the participation of surfactants were revealed, and the specificity of their interaction with the analyzed substance and sorption material was analyzed.

The experimental part was carried out using variable compositions of mobile phases, which included cetylpyridinium chloride, Tween 80 and combinations with the addition of 1-propanol.

The results obtained confirm the effectiveness of the methodological approach and demonstrate the possibility of its implementation in pharmaceutical laboratory practice for quality control of medicines.

Keywords: MICELLAR THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY, PREGABALIN, ANALYTICAL CONTROL METHODS, CETYLPYRIDINIUM CHLORIDE, TWEEN 80.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ	5
ВСТУП.....	6
1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД.....	7
1.1 Міцелярна тонкошарова хроматографія	7
1.1.1 Ідентифікація та візуалізація речовин у тонкошаровій хроматографії.....	7
1.1.2 Моделі ТШХ	8
1.1.3 Міцелярна тонкошарова хроматографія	8
1.1.4 Утримування речовин у МТШХ	9
1.1.5 Модель міцелярної тонкошарової хроматографії	9
1.2 Прегабалін	11
1.2.1 Прегабалін як об'єкт хімічного та фармацевтичного аналізу.....	11
1.2.2 Загальні відомості про прегабалін	12
1.2.3 Механізм дії прегабаліну	13
1.2.4 Фармакологічні ефекти прегабаліну.....	14
1.2.5 Фармакокінетика прегабаліну	15
1.2.6 Клінічне застосування прегабаліну	16
1.2.7 Методи аналізу прегабаліну	17
2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	18
2.1 Обладнання та реактиви	18
2.2 Приготування розчинів	19
2.3 Приготування рухомих фаз, вихідних та робочих розчинів у хроматографічних дослідженнях.....	19
2.4 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних	21
2.5 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 1% - 1-пропанолом	24
2.6 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 2% - 1-пропанолом	27
2.7 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 2% - 1-пропанолом. Аналіз зразків препарату «Лірика» та модельної системи з домішками	31
2.8 Порівняльний аналіз способів нанесення проб у ТШХ.....	33
2.9 Загальний аналіз та інтерпретація результатів дослідження	35
ВИСНОВКИ.....	40
СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ	41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ ТА ТЕРМІНІВ

ТШХ — тонкошарова хроматографія

МТШХ — міцелярна тонкошарова хроматографія

ГАМК — γ -аміномасляна кислота

ПАР — поверхнево-активна речовина

ЦПХ — цетилпіридинію хлорид

Tween 80 — неіоногенна синтетична поверхнево-активна речовина

R_f — фактор утримування

R_s — роздільна здатність

ВСТУП

Останнім часом значно зросла зацікавленість у підвищенні ефективності контролю якості лікарських препаратів, з особливим акцентом на їх правильну ідентифікацію, автентичність та виявлення потенційних фальсифікацій. У зв'язку з цим в центрі уваги як науковців, так і практиків галузі залишаються методи аналізу, які забезпечують оперативне, точне та економічне визначення активних фармацевтичних інгредієнтів.

Однією з таких сполук, що викликає особливий інтерес у сфері фармацевтичного контролю, є прегабалін — штучно синтезований аналог γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) з вираженими знеболювальними, протисудомними та анксиолітичними властивостями. Зважаючи на потужну терапевтичну дію прегабаліну та водночас включення його до переліку контрольованих речовин завдяки можливості зловживання, постає гостра потреба у створенні ефективних аналітичних методик для виявлення прегабаліну, як у ліцензованих препаратах, так і в нелегальних зразках.

Серед різноманіття аналітичних методів тонкошарова хроматографія (ТШХ) вирізняється своєю доступністю, простотою реалізації та здатністю забезпечувати високу аналітичну інформативність. Цей метод дозволяє оперативно ідентифікувати та розділяти компоненти суміші без застосування складної апаратури, що для стандартних умов контролю якості робить його особливо зручним. Крім того, метод тонкошарової хроматографії гнучкий у налаштуванні — параметри його можна адаптувати залежно від властивостей досліджуваних речовин.

Суттєвий внесок у розвиток тонкошарової хроматографії зробила модифікація методу із застосуванням поверхнево-активних речовин (ПАР) у складі рухомої фази — так звана міцелярна ТШХ. Здатність міцелярних систем до вибіркової взаємодії з молекулами аналізованих сполук, забезпечується підвищення надійності й точності визначення. До того ж у такій методиці використання водних розчинів у порівнянні з органічними розчинниками є більш екологічно безпечним.

Ураховуючи значущість прегабаліну та актуальність його контролю як лікарської субстанції, дослідження можливостей ідентифікації цієї сполуки за допомогою міцелярної ТШХ виглядає доцільним і своєчасним. Запропонований підхід має потенціал для розробки доступних, ефективних і зручних методів аналітичного контролю, придатних для лабораторного і виробничого застосування.

Робота виконана у відділі фармацевтичних розробок на підприємстві ПРАТ «Хімфармзавод «Червона зірка». Особлива подяка заступнику директора з наукової діяльності, к.х.н. Ренкевичу А.Ю.

1 ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Міцелярна тонкошарова хроматографія

Хроматографічні методи займають важливе місце в аналітичній хімії, оскільки можуть ефективно розділяти та виявляти компоненти складних сумішей [1-9]. Серед них тонкошарова хроматографія виділяється своєю доступністю та здатністю відразу аналізувати декілька зразків без застосування дорогого обладнання.

Метод тонкошарової хроматографії (ТШХ) заснований на різному ступені зв'язку компонентів суміші з нанесеним на жорстку основу тонким шаром сорбенту.

Одним з головних параметрів у ТШХ є коефіцієнт R_f (фактор утримування), що показує відношення шляху, пройденого аналітом, до шляху, пройденої рухомий фазою. Фактор поділуслугить надійним інструментом у проведенні аналізу та дозволяє точно охарактеризувати процес розподілу.

$$R_f = l/L \quad (1.1)$$

де l — відстань у міліметрах, яку пройшла досліджувана речовина від лінії старту до центру плями; L — відстань у міліметрах, яку пройшов фронт рухомої фази.

Значення хроматографічного коефіцієнта може бути в межах від 0 до 1, де $R_f = 0$ означає повну фіксацію речовини на стаціонарній фазі (вона не просувається із рухомою фазою), а $R_f = 1$ свідчить про повну відсутність взаємодії з адсорбентом — речовина у такому разі, переміщується одночасно з фронтом елюенту.

1.1.1 Ідентифікація та візуалізація речовин у тонкошаровій хроматографії

У рідкісних випадках, коли розділювані речовини мають природне забарвлення (наприклад, пігменти рослинного походження чи рН-індикатори), оцінка результату на хроматографічній пластинці може здійснюватися у звичайному світлі, без додаткових засобів. Більшість сполук, однак, не мають видимого кольору, тому необхідно застосовувати спеціалізовані методики для їх візуалізації.

Використання ультрафіолетового випромінювання є одним із найпоширеніших способів візуалізації, оскільки під його дією багато сполук здатні або випромінювати, або поглинати флуоресценцію. Зазвичай застосовують у таких випадках пластинки з флуоресцентним індикатором.

Однак, існує значна кількість речовин, які у діапазоні УФ не виявляються (наприклад, вуглеводи, аміносполуки, органічні кислоти). У таких випадках застосовують хімічні реагенти, здатні вступати в специфічні реакції з певними функціональними групами.

Ці реагенти поділяються на категорії:

- універсальні (взаємодіють із широким спектром органічних речовин);
- селективні (специфічно реагують з окремими класами чи молекулами).

До універсальних можна віднести сильні окисники: калій перманганат, калій біхромат, хлорати, а також концентровану сірчану кислоту, або її суміші з азотною або хлорною кислотами. Використовується також йодна камера, в якій пари йоду взаємодіють з речовинами, які утворюють тимчасове забарвлення.

Натомість, селективні реагенти, дозволяють визначити наявність певних речовин точково, зокрема алкалоїдів, амінокислот, фенольних сполук. Перевага ТШХ полягає в можливості у межах одного аналізу, орієнтованого на різні функціональні групи поетапного використання кількох реагентів.

1.1.2 Моделі ТШХ

Тонкошарова хроматографія за реалізацією є одним із найпростіших хроматографічних методів. Однак, у науковій літературі залишається найменш опрацьованим теоретичне обґрунтування її процесів. Основні труднощі при математичному описі пов'язані з тим, що на відміну від рідинної чи газової хроматографії, у ТШХ протягом процесу розділення швидкість переміщення рухомої фази змінюється [2].

Більшість наявних теоретичних моделей до моделювання ТШХ були запозичені з підходів, розроблених для газової хроматографії. Проте, оскільки у планарній системі фізико-хімічні умови переносу речовин значно відрізняються такий підхід не зовсім коректний. Таким чином, доцільним може бути використання подібних моделей не для точного математичного моделювання, а лише для приблизного, напівкількісного опису переміщення по хроматографічній пластинці зон речовин.

1.1.3 Міцелярна тонкошарова хроматографія

Різновидом ТШХ є міцелярна тонкошарова хроматографія (МТШХ), у якій використовують як елюент водні розчини поверхнево-активних речовин (ПАР), в яких концентрація перевищує критичну точку міцелоутворення (ККМ). У таких системах ПАР формують надмолекулярні агрегати — міцели, що поєднують гідрофобні й гідрофільні

властивості. Це створює сприятливі умови для складних взаємодій між сорбентом, міцельною фазою і аналізованою речовиною, що сприяє ефективному розділенню як неполярних, так і полярних компонентів сумішей. Завдяки цьому у роботі з багатокомпонентними зразками МТШХ демонструє універсальність [10].

МТШХ поділяють на кілька режимів залежно від вмісту ПАР та органічного модифікатора за аналогією з підходами, прийнятими у міцелярній ВЕРХ. Якщо внесена органічна складова не сприяє утворенню міцел, а концентрація ПАР нижча за ККМ, основна взаємодія відбувається без формування міцелярних структур через утворення іонних пар, це відповідає іон-парному механізму хроматографії. У разі, коли концентрація ПАР перевищує ККМ, а об'єм органічного розчинника (наприклад, у разі використання ізопропанолу) не перевищує 20%, система функціонує в міцелярному режимі — з наявністю міцел, у яких відбувається розчинення аналіту. Якщо ж навіть за високого вмісту ПАР частка органічного модифікатора перевищує 40%, міцели не утворюються — у цьому випадку кажуть про субміцелярний режим.

1.1.4 Утримування речовин у МТШХ

У міцелярній тонкошаровій хроматографії механізм утримання речовин базується на трьох ключових положеннях. По-перше, міцели здатні стабілізувати та інкорпорувати сполуки, які не розчиняються у воді. По-друге, міцелярне середовище може вибірково відокремлювати сполуки з різними фізико-хімічними характеристиками завдяки електростатичному притягання, гідрофобній взаємодії та донорно-акцепторним ефектам. І, по-третє, в процесі хроматографічного аналізу, поверхнево-активні речовини можуть адсорбуватись на шарі сорбенту, модифікуючи його властивості.

Результативність взаємодії аналізованої речовини з міцелярною системою обумовлюється типом використаної ПАР, структурними особливостями міцел, а також природою сорбційного матеріалу. Додатково на результати впливають наявність ароматичних або ненасичених фрагментів, заряд молекули (активніше реагують із катіонними речовинами аніонні ПАР), а також баланс між ліпофільністю та гідрофільністю аналізованої сполуки й міцелярного носія.

1.1.5 Модель міцелярної тонкошарової хроматографії

Згідно з теоретичною моделлю, яка у системах з міцелярною рухомою фазою пояснює особливості хроматографічної поведінки розчинених сполук, механізм їхнього розподілу

складніший, ніж у випадку з використанням водно-органічних елюентів традиційної тонкошарової хроматографії. У таких умовах аналіт розподіляється не лише між рухомою та стаціонарною фазами, як це характерно для класичних схем, а диференціюється додатково всередині самої рухомої фази — зокрема між гідрофобними мікрооточеннями, сформованими міцелами поверхнево-активних речовин та її водною складовою (рисунок 1.1).

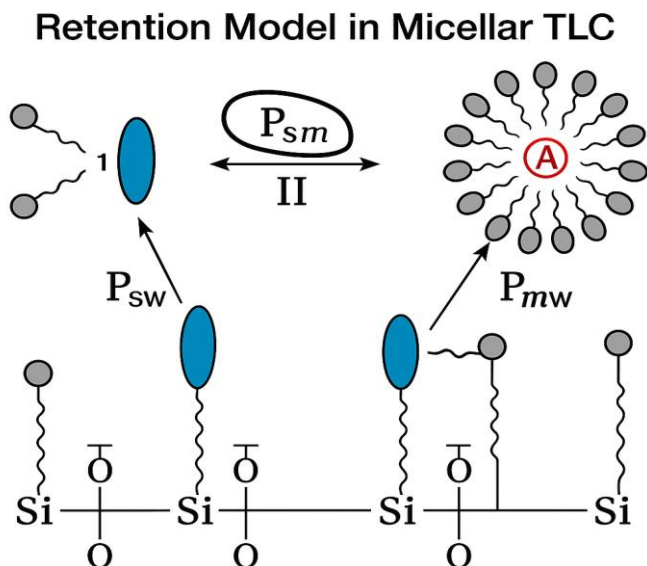


Рисунок. 1.1 Модель МТШХ.

У центрі цієї моделі взаємодії аналіту з компонентами хроматографічної системи лежить концепція трьох незалежних механізмів. Перший з них — це поділ між сорбентом та водною фазою. Другий механізм описує взаємодію міцел, що сорбовані на поверхні сорбенту з аналітом. Третій шлях — це розподіл аналіту між внутрішньою частиною міцели і водним розчином.

У МТШХ хроматографічна поведінка речовини залежить від ряду факторів: заряду та морфології міцелярної фази, хімічних властивостей аналізованої сполуки, а також характеристик нерухомої фази.

Міцелярна тонкошарова хроматографія є важливим інструментом у фармацевтичному аналізі, оскільки дає змогу виявляти домішки, ідентифікувати активні інгредієнти, підтверджувати їх автентичність та контролювати стабільність лікарських засобів. Метод ефективно розділяє сполуки з різними ступенями полярності, зокрема гідрофобні та гідрофільні компоненти, що актуально особливо при дослідженні складних лікарських форм. Заміна на водні міцелярні системи органічних розчинників робить метод безпечнішим для оператора і для навколишнього середовища.

Метод використовується активно для дослідження таких сполук, як амінокислоти, пептиди, вітаміни, жирні кислоти, стероїди тощо. висока ефективність розділення у випадках мінімальних відмінностей у структурі аналізованих речовин досягається завдяки можливості міцелярної фази одночасно взаємодіяти з неполярними та полярними ділянками молекул.

1.2 Прегабалін

1.2.1 Прегабалін як об'єкт хімічного та фармацевтичного аналізу

У сучасній медицині більшу увагу дедалі приділяють препаратам, що впливають на ЦНС (центральну нервову систему), особливо в контексті лікування тривалого больового синдрому, тривожних розладів та епілептичних станів. Стійкі форми нейропатичного болю, які істотно знижують якість життя, створюють потребу у розробці нових засобів з мінімальним рівнем побічних ефектів [11, 12].

Серед сучасних медикаментів, що відповідають цим вимогам, особливе місце займає прегабалін — синтетичний препарат, що відноситься до нової групи протисудомних засобів і центрально діючих анальгетиків (рисунок 1.2). Він є аналогом γ -аміномасляної кислоти (ГАМК) за хімічною будовою, однак, механізм його дії відрізняється від класичних ГАМК-міметиків принципово. Впливає препарат на нейротрансмітерні процеси, регулюючи вивільнення у синаптичних щілинах медіаторів, що зумовлює його терапевтичну дію при генералізованій тривожності, епілепсії, та хронічному нейропатичному болю.



Рисунок 1.2 Прегабалін.

1.2.2 Загальні відомості про прегабалін

Прегабалін представник класу габапеноїдів — фармакологічно активних речовин, синтетичні аналоги γ -аміномасляної кислоти (ГАМК). ГАМК відіграє ключову роль у регуляції синаптичної передачі і підтриманні збудливості нейронів у фізіологічних межах та є одним з гальмівних нейромедіаторів центральної нервової системи. Проте, прегабалін не взаємодіє з її рецепторами (GABA-A і GABA-B) на відміну від ГАМК, і не змінює у мозку рівень ГАМК. Натомість, дія прегабаліну реалізується шляхом зв'язування з $\alpha 2\delta$ -субодиницею за допомогою модуляції активності потенціалзалежних кальцієвих каналів типу P/Q, що в знижує подальшому вивільненню збуджувальних нейромедіаторів. Механізм цей зумовлює його проти судомний, анальгетичний та анксиолітичний ефекти.

Принципове значення для фармакологічної дії прегабаліну має його хімічна структура (рисунок 1.3). Відповідно до IUPAC систематична назва — (S)-3-(амінометил)-5-метилгексанова кислота, що відображає у молекулі наявність амінометильної групи (при третій позиції) та метильної групи (при п'ятій). Це є похідною шестичленного вуглеводневого ланцюга із розгалуженням, що забезпечує його певну конформаційну гнучкість. Молекула має кислотні властивості, завдяки наявності карбоксильної групи, а основні характеристики зумовлює аміногрупа. Прегабалін, таким чином, є амфотерною сполукою. Високій розчинності в біологічних рідинах, що важливо для лікарського засобу, призначеного для перорального прийому сприяє саме ця хімічна амфотерність [13-37].

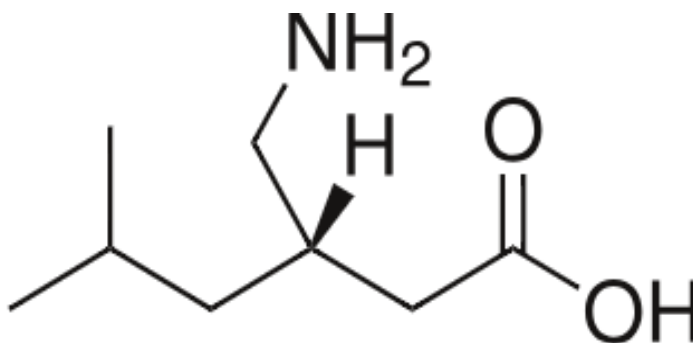


Рисунок 1.3 Структурна формула прегабаліну

Молекулярна брутто формула прегабаліну — $C_8H_{17}NO_2$. Молекулярна маса дорівнює 159,23 г/моль, що вказує на невеликий розмір молекули — це позитивно позначається на biodostupnosti препарату та швидкості його абсорбції через слизові оболонки. Його полярна поверхнева площа (PSA) — $63,3 \text{ \AA}^2$ — крім того, забезпечує достатню здатність проникати крізь гематоенцефалічний бар'єр без ризику накопичення в ліпофільних тканинах, що часто спостерігається з бензодіазепінами або антидепресантами.

Важливою особливістю його хімічної структури є наявність у молекулі асиметричного центру, атома вуглецю, до якого приєднані різні чотири замісники (рисунок 1.3). Це означає, що прегабалін існує у вигляді двох оптичних ізомерів (енантіомерів), з яких є активною з точки зору фармакології лише S-форма. Саме вона і використовується у медичній практиці, тоді як R-енантіомер зовсім не проявляє клінічно значущої активності. Така енантіоселективність пояснює точковий вплив на певні рецепторні структури прегабаліну, знижуючи ризик небажаних ефектів та взаємодій з неспорідненими молекулярними мішенями.

Окремо слід звернути увагу також на деякі параметри молекули, що мають значення у аналітичній хімії та фармакокінетиці:

- Донорів водневого зв'язку: 2
- Акцепторів водневого зв'язку: 3
- Оберткових зв'язків: 5
- LogP (коефіцієнт гідрофобності): -1,6

Значення LogP свідчить саме про гідрофільний характер прегабаліну, що корелює з високою розчинністю у воді, ефективною системною дією саме при пероральному прийомі та швидкою абсорбцією в ШКТ. З іншого боку, низький рівень гідрофобності дозволяє молекулі прегабаліну проходити крізь клітинні мембрани без надмірної кумуляції у жирових тканинах, що при довготривалому застосуванні знижує ризик передозування.

1.2.3 Механізм дії прегабаліну

Прегабалін належить до групи таких лікарських засобів центральної дії, що чинять вплив шляхом селективної модуляції кальцієвих потенціалзалежних каналів на нейрональну активність (рисунок 1.4).

Основною мішенню прегабаліну є $\alpha 2\delta$ -субодиниця потенціалзалежних кальцієвих каналів (типу P/Q), яка розташована саме у пресинаптичних терміналях нейронів. Кальцієві канали беруть активну участь в процесі вивільнення нейромедіаторів. У нормі, при проходженні потенціалу дії по аксонам, відкриваються кальцієві канали, іони кальцію (Ca^{2+}) швидко надходять у клітини. Це ініціює злиття везикул із плазматичною мембраною. Вивільнення нейромедіаторів у синаптичну щілину. Прегабалін зв'язується з $\alpha 2\delta$ -субодиницею та пригнічує функціональну активність каналів і знижується приплив кальцію в клітину, що безпосередньо обмежує виділення таких збуджувальних медіаторів, як речовина P, глутамат, норадреналін, CGRP (кальцитонін-ген-зв'язаний пептид) та зменшує генерацію больових і епілептичних імпульсів.

Особливість механізму дії, прегабаліну не знижує активність усіх нейронів одночасно, лише селективно модулює активні синапси, які перебувають у стані гіперзбудженості. Завдяки підвищеній експресії $\alpha 2\delta$ -субодиниці такий ефект реалізується у патологічно змінених ділянках нервової системи при хронічному болю та судомач. У пацієнтів з фокальною епілепсією сприяє зменшенню частоти нападів.

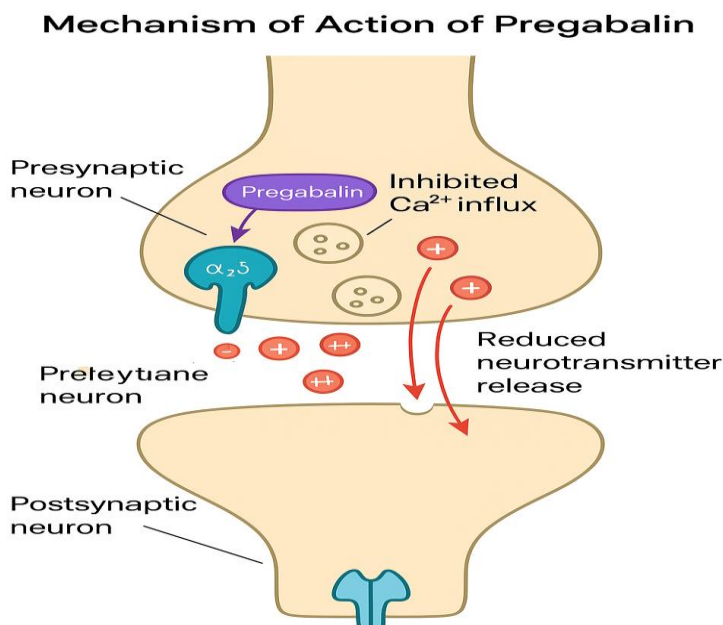


Рисунок 1.4 Механізм дії прегабаліну

Вплив прегабаліну на ГТР (генералізовані тривожні розлади) реалізується саме за рахунок зменшення вивільнення глутамату та норадреналіну в тих ділянках головного мозку, які беруть участь у формуванні емоційного контролю у мигдалевидному тілі, гіпокампі та префронтальній корі. Цей механізм дозволяє знизити нервову напругу, тривожність, покращити якість сну, зменшити когнітивні симптоми без седативних препаратів або бензодіазепінів.

Прегабалін на відміну від багатьох препаратів з подібною дією, не впливає на зворотне захоплення моноамінів (дофаміну, серотоніну або норадреналіну), не інгібує ферменти, які пов'язані з нейромедіаторним обміном, не блокує NMDA- та AMPA-рецептори [12].

1.2.4 Фармакологічні ефекти прегабаліну

Фармакологічна дія прегабаліну охоплює спектр ефектів, що пов'язано з його впливом на патофізіологічні процеси у центральній та периферичній нервовій системі

(рисунок 1.5). Терапевтичні властивості препарату включають знеболювальний (щодо нейропатичного болю), протисудомний та протитривожний ефекти. Це пояснюється здатністю прегабаліну модулювати вивільнення збуджувальних нейромедіаторів (норадреналін, глутамат, субстанція P, CGRP та інші).

Один з важливих ефектів прегабаліну це анальгезія при нейропатичних формах болю.

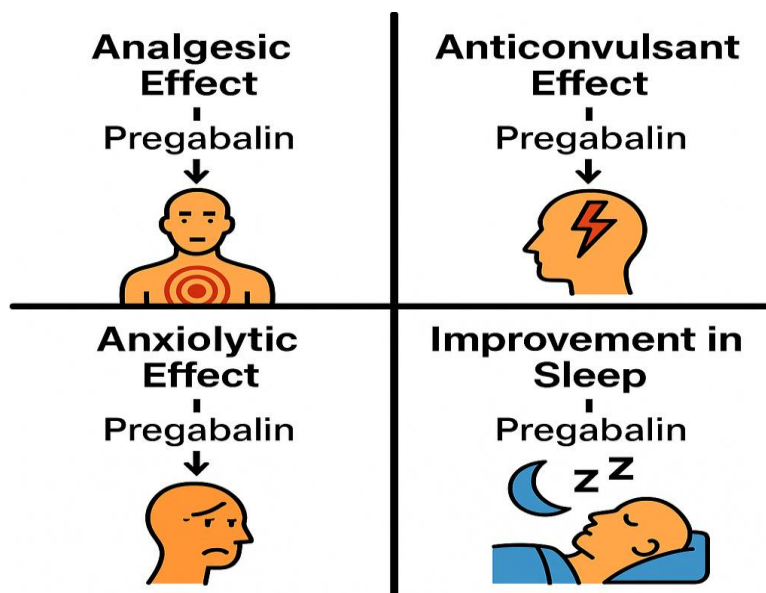


Рисунок 1.5 Фармакологічні ефекти прегабаліну

1.2.5 Фармакокінетика прегабаліну

Фармакокінетичні властивості прегабаліну одна з ключових причин його широкого клінічного застосування (рисунок 1.6). Препарат характеризується високою біодоступністю, швидким всмоктуванням, передбачуваним профілем елімінації та розподілу, низькою міжіндивідуальною варіабельністю. Прегабалін демонструє завдяки цим особливостям стабільну ефективність при різних клінічних станах, включаючи епілепсію, тривожні розлади та нейропатичний біль.

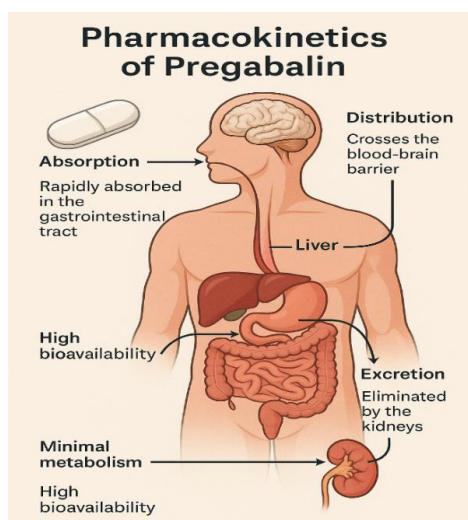


Рисунок 1.6 Фармакокінетика прегабаліну

1.2.6 Клінічне застосування прегабаліну

Прегабалін у сучасній фармакотерапії є одним із найбільш універсальних засобів психіатричних, неврологічних та больових синдромів (рисунок 1.7). Клінічне застосування прегабаліну ґрунтується на комплексному впливі саме на нейрональні механізми збудження і зниженні патологічної активності в центральній та периферичній нервовій системі. У зв'язку з цим, показання до застосування препарату охоплює соматичні та психоемоційні порушення, що супроводжуються хронічним болем або гіперзбудженням.



Рисунок 1.7 Препарат «Лірика»

1.2.7 Методи аналізу прегабаліну

Фізико-хімічні властивості прегабаліну.

Це гідрофобний, білий або майже білий кристалічний твердий порошок, назва якого за IUPAC — (3S)-3-(амінометил)-5- метилгексанова кислота. Це структурно подібна сполука габапентину. Він має номер CAS 148553-50-8. Він має pK_{a1} 4,2 (4,2) та pK_a (10,6). Він легко розчинний у воді та у водних розчинах, які є як основними, так і кислими. Він має температуру плавлення 186–188°C та температуру кипіння 274°C при 760 мм рт. ст. Він класифікується як біофармацевтичний препарат I класу (висока проникність, висока розчинність) [17].

Різні аналітичні методи для індивідуальної оцінки прегабаліну були опубліковані в літературі з 2001 року [13-37]. Ці підходи класифікуються як компендіальні, так і некомпендіальні методи. Аналітичні методи для прегабаліну описані в Індійській фармакопеї (IP) та Фармакопеї США (USP).

Компендіальний аналітичний метод для прегабаліну

Згідно з USP, рідинна хроматографія описана для аналізу прегабаліну за таких експериментальних умов: стаціонарна фаза з 5-мм колонкою L1 (4,6 мм, 25 см) та рухома фаза, що містить суміш ацетону і води (5:95, об./об.) з об'ємом ін'єкції 20 мкл при швидкості потоку 1,0 мл/хв з максимальною довжиною хвилі 205 нм. Хоча препарат має фармакопейний статус, існують некомпендіальні методи аналізу, розроблені різними дослідниками [13-37]. Це спектроскопічні, хроматографічні та дефісні методи.

Натомість серед цих методів міцелярну тонкошарову хроматографію не представлено. Таким чином, стає актуальною задача розробка саме цього методу.

2 ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Для оптимізації умов визначення прегабаліну методом МТШХ були взяті зразки лікарських форм, які містять прегабалін як фармакологічно активну сполуку.

2.1 Обладнання та реактиви

Обладнання

Ваги лабораторні МКС-600

Ваги аналітичні OHAUSE EX-5

РН-метр Mettler Toledo FiveEasy Plus F20

Магнітна мішалка

Пульверизатор скляний з гумовою грушею

Сушильна шафа лабораторна

Шейкер

Пластинка силікогелева TLC Silica gel 60

Хроматографічні камери: скляна прямокутна камера розміром 30x30x10 см (2 шт.)

Шприц для ведення проб у газовій хроматографії об'ємом 10 μ L.

Реактиви

Поверхнево активні речовини:

- Tween 80
- ЦПХ (цетилпіридинію хлорид)

Модифікуюча добавка:

- 1 – Пропанол

Реактив для дериватизації:

- Нінгідрин

Стандартні зразки, субстанції та розчинники:

- Високоочищена вода для хроматографії, Р
- Метанол, Р
- Лактоза
- Крохмаль кукурудзяний
- Капсули желатинові
- Оригінальний препарат (Лірика)

- СЗ Прегабаліну
- Субстанція Прегабаліну
- Хлористоводнева кислота 0,1 М
- Ацетон

2.2 Приготування розчинів

Для приготування всіх проб використовувався Метанол Р. Зважування проводилось на аналітичних вагах, щоб дотримуватись точних наважок, субстанцій та стандарних зразків. Вихідні розчини готувалися у мірному посуді класу А.

2.3 Приготування рухомих фаз, вихідних та робочих розчинів у хроматографічних дослідженнях

Рухома фаза

Розчин ЦПХ був приготовлений з високоочищенні води для хроматографії, Р. Концентрація 0,02 моль/л, обумовлена тим, що нам було важливо створити критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ).

$$\text{ЦПХ: } m = 0,02 \times 0,1 \times 340 = 0,68 \text{ г}$$

Розчин Tween 80 та готували шляхом розчинення точної наважки ПАР у воді для отримання концентрації 0.05 моль/л. Обрана концентрація також обумовлена тим, що важливо створити ККМ.

$$\text{Tween 80: } m = 0,05 \times 0,1 \times 1310 = 6,55 \text{ г}$$

Під час приготування рухомих фаз на основі цетилпіридинію хлориду (ЦПХ) та Tween 80, було зафіксовано певні труднощі. Характер проблеми полягав у тому що, під час розчинення цетилпіридинію хлориду (ЦПХ) та Tween 80 утворювалась піна. Вона і спричиняла головну проблему з доведенням об'єму розчинів до мітки в мірних колбах. Ця проблема викликала труднощі, оскільки проблема призводила до похибок у концентрації розчинів, а у випадку міцелярної тонкошарової хроматографії, це особливо важливо.

З метою усунення зазначених проблем та забезпечення високої точності приготування розчинів, було прийнято рішення використовувати розрахунок концентрацій на основі молярності, що передбачає визначення кількості речовини на масу розчинника, а не на об'єм розчину. Такий підхід дозволив уникнути необхідності доведення розчинів до мітки та спростив процедуру підготовки розчинів з урахуванням специфічних властивостей поверхнево-активних речовин.

У межах даної методики проведено окреме зважування точної наважки досліджуваних речовин та необхідної кількості води обсягом 100 г. Для оптимізації процесу розчинення та зменшення інтенсивності піноутворення, спершу половина об'єму води використовувалась для розчинення відповідної речовини. Після цього здійснювалась корекція рівня рН розчину до значення 2,0 шляхом додавання кислотного регулятора. Завершальною стадією було доведення об'єму розчину до заданої маси 100 г шляхом поступового додавання решти води.

Застосування моляльного підходу дозволило нам не лише уникнути утворення надлишкової піни, а й ще забезпечити високу точність концентрації ПАР у розчині, що є достатньо важливою частиною для дослідження процесів міцелярної тонкошарової хроматографії та оцінки параметрів взаємодії між аналітами та фазами розділення.

Термін придатності 1 доба.

Модернізація рідкої фази

Щоб покращити елюючі властивості розчинів рухомих фаз та оптимізувати процес міграції зон у тонкошаровій хроматографії, було прийнято рішення модифікувати міцелярні розчини шляхом додавання до них органічних модифікаторів. У якості модифікатора було обрано 1-пропанол з концентрації 2%, що сприяло покращенню аналітів з рухомою фазою.

По закінченню приготування розчинів цетилпіридинію хлориду та Tween 80 у відповідних концентраціях, до кожного з них додавали спочатку по 1 мл 1-пропанолу, а потім по 2 мл та ретельно перемішували. Введення 1-пропанолу продемонструвало покращення елюючих властивостей міцелярної системи, забезпечуючи ефективне розділення компонентів у досліджуваних розчинах під час хроматографічного аналізу.

Термін придатності 1 доба.

Приготування вихідних розчинів

Для забезпечення проведення хроматографічного аналізу було підготовлено вихідні розчини стандартних зразків прегабаліну, допоміжних речовин (лактози моногідрату та крохмалю кукурудзяного), а також зразок лікарського препарату «Лірика».

Розчин стандартного зразка прегабаліну готували з концентрації 1 мг/мл шляхом розчинення 10 мг прегабаліну у метанолі з доведенням об'єму до 10 мл. Розчин перемішували до повного розчинення речовини.

Розчини лактози моногідрату та кукурудзяного крохмалю готували наступним чином. Наважку масою 1г розчиняли у 100 мл метанолу.

У даному випадку, концентрації розчинів лактози та крохмалю не мала ніякого впливу для виконання поставленого завдання, а використовувалося для демонстрації можливих аналітичних перешкод при дослідженні готових лікарських форм. Таким чином, впевнено

можемо стверджувати, що у застосованих умовах міцелярної тонкошарової хроматографії (МТШХ) зазначені допоміжні речовини ніяк не впливу на результат аналізу.

Враховуючи погану розчинність кукурудзяного крохмалю та лактози моногідрату у метанолі, утворена система являла собою суспензію.

А для забезпечення чистоти проб та уникнення наявності механічних домішок, було вирішено центрифугувати розчини лактози моногідрату та крохмалю кукурудзяного для осадження нерозчинених часток. Після центрифугування надосадову рідину відбирали та додатково фільтрували через шприцеві фільтри з розміром пор 0,45 мкм.

Розчин зразка лікарського засобу «Лірика», що містить 75 мг прегабаліну в одній капсулі, готували шляхом розчинення вмісту капсули у 75 мл метанолу, дотримуючись співвідношення 1 мг прегабаліну на 1 мл метанолу. Розчин перемішували до утворення однорідної системи, після чого також фільтрували через шприцевий фільтр з порами 0,45 мкм для забезпечення чистоти аналізованого розчину.

Термін придатності 1 доба.

Розчин нінгідрину для прояву хроматограм

0.2 г нінгідрину поміщали в мірну колбу місткістю 100 мл, розчиняли в 50 мл Ацетону, Р, доводили об'єм розчину Ацетоном, Р до мітки і перемішували. Розчин зберігали в темному місці і використовували протягом 3 місяців.

2.4 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних

Для виконання хроматографічного аналізу було використано дві хроматографічні пластинки розміром 10 × 15 см, вкриті шаром силікагелю TLC Silica gel 60. Від стартової лінії було відступлено 1,5 см від нижнього краю пластинок, висота фронту рухомої фази була встановлена на 10 см.

На лінії старту було нанесено дві проби: стандартний зразок прегабаліну (СЗ Прегабаліну) та субстанцію прегабаліну. Нанесення здійснювали за допомогою мікрошприцю об'ємом 10 мкл, який ми використовували для кожної проби. Для більш швидкого висихання нанесених проб використовували ручну грушу, спрямовуючи потік повітря безпосередньо на місце нанесення.

Заздалегідь були підготовлені хроматографічні камери з різними рухомими фазами (рисунок 2.1):

- камера з рухомою фазою на основі ЦПХ (цетилпіридинію хлориду), температура середовища становила 22,3°C.

- камера з рухомою фазою на основі Tween 80, із температурою середовища 21,9°C.

Об'єм рухомої фази не перевищував рівень стартової лінії та складав приблизно об'єм 15,0 мл. Після поміщення пластинок у камери було розпочато процес хроматографування.

У ході дослідження спостерігалось, що міграція фронту рухомої фази Tween 80 відбувалась набагато повільніше порівняно з фазою на основі ЦПХ. Час досягнення фронтом контрольної позначки становив:

- для рухомої фази ЦПХ — 48 хвилини.
- для рухомої фази Tween 80 — 1 година 38 хвилин.

Це свідчить про підвищену полярність та більшу в'язкість рухомої фази, що базується на Tween 80. Завдяки чому уповільнюється процес міграції та покращується роздільна здатність при аналізі складних сумішей.



а

б

Рисунок 2.1. Хроматографічні камери з різними рухомими фазами:

а — на основі ЦПХ;

б — на основі Tween 80

Після завершення хроматографування пластинки були вийняті з камер та висушені при лабораторній температурі до повного висихання. Для візуалізації зон хроматографічного розділення пластинки обприскували розчином нінгідрину, після чого поміщали у сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C. Після виймання з сушильної шафи результати аналізу було зафіксовано візуально та фотодокументально (рисунок 2.2.).

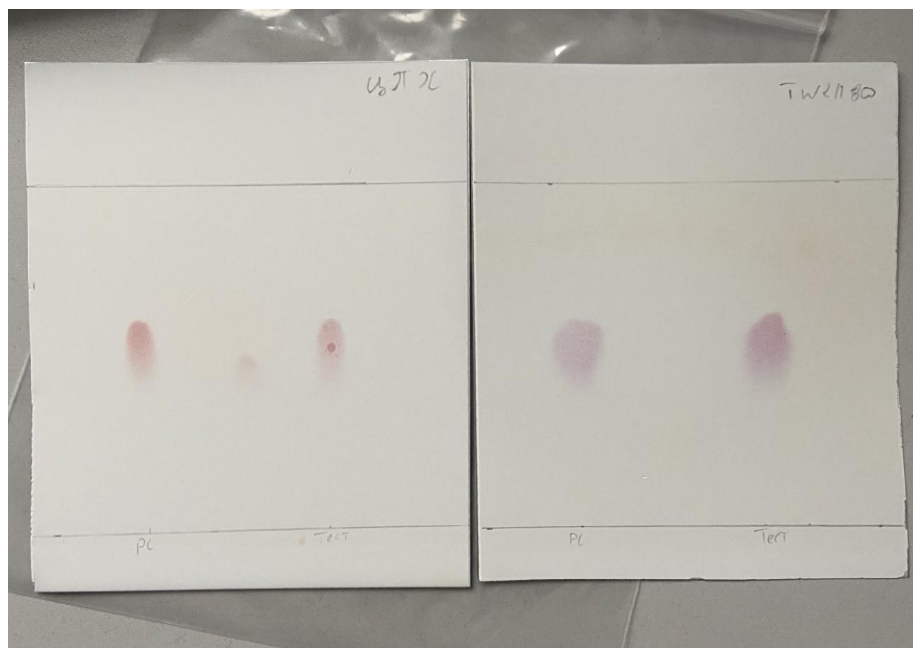


Рисунок 2.2. Результати тонкошарової хроматографії

Результати тонкошарової хроматографії, проведеної з використанням двох різних рухомих фаз:

Ліва пластинка — використана рухома фаза на основі цетилпіридинію хлориду (ЦПХ). На пластинці чітко видно дві плями:

Ліва пляма (PL) — стандартний зразок прегабаліну.

Права пляма (Test) — субстанція прегабаліну.

Інтенсивність забарвлення плям висока, але спостерігається розмитість контурів, що свідчить про певну дифузію речовини.

Права пластинка — використана рухома фаза на основі Tween 80. Також спостерігаються дві плями:

Ліва (PL) — стандартний зразок прегабаліну.

Права (Test) — субстанція прегабаліну.

У даному випадку плями мають більш виражені межі, проте міграція речовини відбулася на меншій відстані порівняно з пластинкою, де використовувалась рухома фаза ЦПХ.

Це свідчить про те, що рухома фаза ЦПХ забезпечує швидшу міграцію речовини, тоді як Tween 80, за рахунок вищої в'язкості та полярності, уповільнює міграцію, що можна використовувати для покращення розділення в складних сумішах.

В обох випадках застосовано проявлення нінгідриновим реагентом, що дало характерне фіолетове забарвлення плям, підтверджуючи наявність прегабаліну.

Формула для розрахунку фактора утримування R_f (Retention Factor) в тонкошаровій хроматографії має вигляд:

$$R_f = \frac{d_{\text{речовини}}}{d_{\text{фронту}}} \quad (2.1)$$

де $d_{\text{речовини}}$ — відстань від лінії старту до центру плями речовини (у мм); $d_{\text{фронту}}$ — відстань від лінії старту до фронту розчинника (у мм).

$$R_f = \frac{35 \text{ мм}}{100 \text{ мм}} = 0,35 \quad (2.2)$$

Пластинка з рухомою фазою ЦПХ:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,35$

Субстанція (Test): $R_f = 0,36$

Пластинка з рухомою фазою Tween 80:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,33$

Субстанція (Test): $R_f = 0,34$

Під час проведення першого дослідження було визначено фактор утримування (R_f) прегабаліну для досліджуваної субстанції та стандартного зразка прегабаліну. Підтвердили правильність ідентифікації діючої речовини.

Порівняльний аналіз продемонстрував, що при використанні рухомої фази Tween 80 міграція зон відбувалася повільніше, ніж у системі з ЦПХ, що свідчить про вплив складу рухомої фази на процес розділення.

Отримані результати підтвердили ефективність розробленої методики для якісного аналізу прегабаліну.

2.5 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 1% - 1-пропанолом

З метою вдосконалення хроматографічного розділення та покращення рухомості фронту розчинника було проведено другий дослід із модифікацією складу рухомої фази шляхом введення 1% 1-пропанолу до складу міцелярних розчинів на основі цетилпіридинію хлориду (ЦПХ) та Tween 80.

Для проведення дослідження було підготовлено дві хроматографічні пластинки розміром 10×15 см, вкриті шаром силікагелю TLC Silica gel 60. Від лінії старту відступали 1,5 см від нижнього краю пластинки, висота фронту розчинника була встановлена на 10 см.

На лінії старту зроблено відповідні позначки для двох проб: стандартного зразка прегабаліну (СЗ Прегабаліну) та субстанції. Нанесення здійснювали за допомогою мікропіпетки в об'ємі 10 мкл кожної проби. Для прискорення висихання нанесених плям використовували потік повітря за допомогою лабораторної груші.

Попередньо були підготовлені хроматографічні камери з модифікованими рухомими фазами:

- ЦПХ + 1% 1-пропанолу при температурі середовища 21,6°C.
- Tween 80 + 1% 1-пропанолу при температурі середовища 21,1°C.

Об'єм рухомої фази в кожній камері становив 15 мл та не перевищував рівень стартової лінії. Після поміщення пластинок у камери було розпочато процес хроматографування.

У ході спостережень встановлено, що додавання 1-пропанолу покращило рухливість рухомої фази Tween 80, однак навіть за цих умов фронт розчинника в камері з ЦПХ досягав контрольної позначки швидше (рисунок 2.3.).

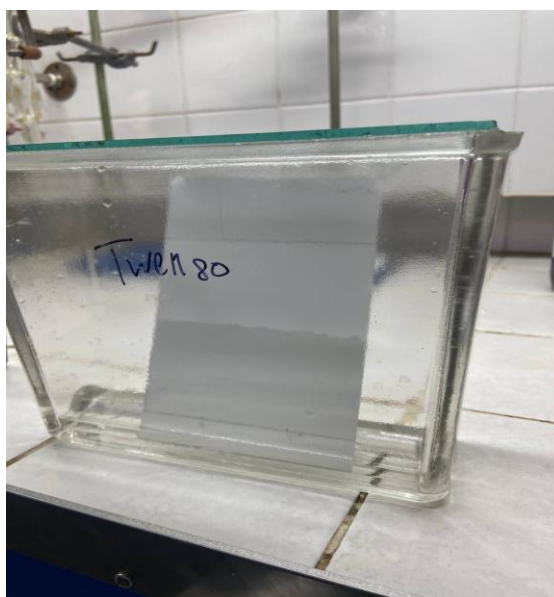


Рисунок 2.3. Хроматографічна камера з рухомою фазою Tween 80 із додаванням 1-пропанолу:

Час проходження фронту розчинника склав:

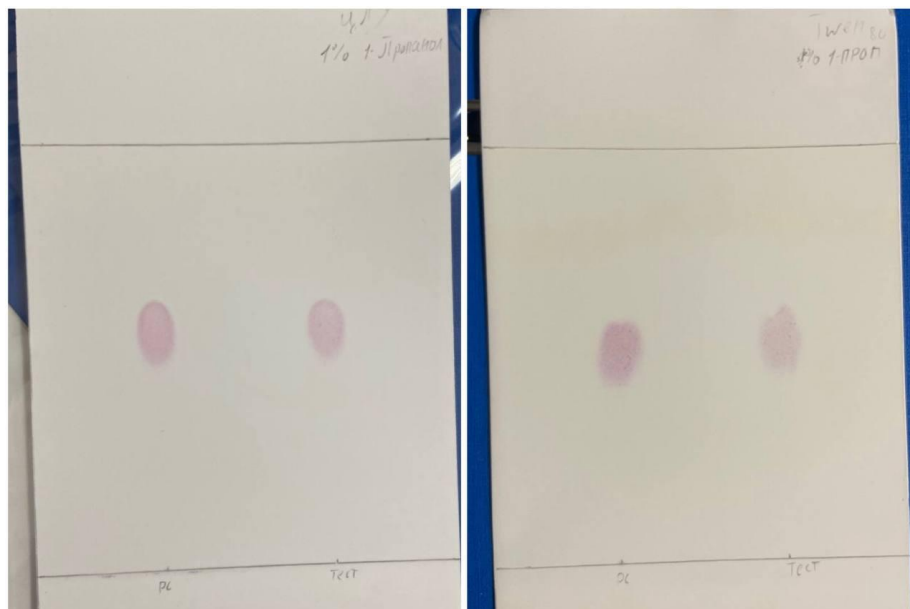
- для рухомої фази ЦПХ + 1% 1-пропанолу — 37 хвилин.
- для рухомої фази Tween 80 + 1% 1-пропанолу — 1 година 33 хвилини.

Це свідчить про те, що введення органічного модифікатора сприяє покращенню рухомості рухомої фази, однак вплив складу ПАР залишається визначальним фактором у швидкості міграції.

Після завершення хроматографування пластинки були вилучені з камер та висушені при лабораторній температурі. Для візуалізації зон розділення пластинки обробляли розчином нінгідрину, після чого поміщали у сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C. Після завершення обробки спостерігали результати розділення (рисунок 2.4.).

На першій пластинці (рухома фаза на основі ЦПХ + 1% 1-пропанолу) чітко видно дві виражені плями фіолетового кольору, розташовані на однаковій висоті відносно стартової лінії (рисунок 2.4.а). Це свідчить про ідентичні значення R_f для стандартного зразка та субстанції прегабаліну, що підтверджує автентичність досліджуваної субстанції.

На другій пластинці (рухома фаза на основі Tween 80 + 1% 1-пропанолу) спостерігається аналогічна картина: плями мають схожу інтенсивність забарвлення та також розташовані на однаковому рівні (рисунок 2.4.б). Це свідчить про однакову міграційну здатність стандартного зразка та субстанції у даній рухомій фазі.



а

б

Рисунок 2.4. Результати тонкошарової хроматографії із додаванням 1% 1-пропанолу: а — рідка фаза ЦПХ; б — рідка фаза Tween 80

Після обробки пластинок нінгідриним реагентом плями прегабаліну проявляються характерним фіолетовим кольором, що підтверджує наявність первинної аміногрупи в структурі прегабаліну.

В обох випадках отримані значення фактора утримування (R_f) є досить високими (близько 0,62–0,64), що вказує на підвищення рухливості речовин у присутності органічного модифікатора (1-пропанолу). Це дозволяє зробити висновок про те, що введення 1-

пропанолу до складу рухомої фази покращує міграцію прегабаліну, полегшуючи процес розділення (таблиця 2.1).

Пластинка з рухомою фазою ЦПХ + 1% 1-пропанол:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,64$

Субстанція (Test): $R_f = 0,64$

Пластинка з рухомою фазою Tween 80 + 1% 1-пропанол:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,62$

Субстанція (Test): $R_f = 0,62$

Таблиця 2.1. Порівняння умов хроматографії та отриманих результатів

Параметр	Перше дослідження (без пропанолу)	Друге дослідження (з 1% 1-пропанолу)
Модифікація рухомої фази	Відсутня	Додано 1% 1-пропанолу
Типи рухомих фаз	ЦПХ, Tween 80	ЦПХ + 1% 1-пропанол, Tween 80 + 1% 1-пропанол
Час проходження фронту (ЦПХ)	43 хв	37 хв
Час проходження фронту (Tween 80)	1 год 36 хв	1 год 33 хв
Значення R_f (ЦПХ)	~0,35–0,36	~0,64
Значення R_f (Tween 80)	~0,33–0,34	~0,62
Інтенсивність прояву плям	Слабкіша, менш чіткі контури	Більш насичені, чіткі плями
Міграція речовин	Менш інтенсивна	Суттєво покращена
Висновок	Міграція повільна, R_f низькі	Підвищена рухливість речовин, збільшення R_f

2.6 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 2% - 1-пропанолом

З метою подальшого покращення хроматографічного розділення та прискорення міграції зон було проведено третій дослід, у якому концентрацію органічного модифікатора — 1-пропанолу — збільшено до 2% у складі міцелярних рухомих фаз на основі цетилпіридинію хлориду (ЦПХ) та Tween 80.

Для проведення експерименту було підготовлено дві хроматографічні пластинки розміром 10 × 15 см, вкриті шаром силікагелю TLC Silica gel 60. Від лінії старту відступили 1,5 см від нижнього краю пластинок, висота фронту рухомої фази становила 10 см.

На лінії старту було зроблено відповідні позначки для двох проб: стандартного зразка прегабаліну (PL) та субстанції (Test). Нанесення проб виконували за допомогою мікропіпетки по 10 мкл кожної проби. Для прискорення висихання нанесених плям застосовували лабораторну грушу.

Заздалегідь були підготовлені хроматографічні камери з модифікованими рухомими фазами:

- ЦПХ + 2% 1-пропанолу при температурі середовища 20,9°C;
- Tween 80 + 2% 1-пропанолу при температурі середовища 22,0°C.

Об'єм рухомої фази в кожній камері складав 15 мл, що не перевищувало рівень стартової лінії. Після поміщення пластинок у камери розпочато хроматографування.

У ході спостережень встановлено, що збільшення вмісту 1-пропанолу у складі рухомої фази сприяє покращенню її рухомості. Пластинка з рухомою фазою на основі Tween 80 демонструвала більш активну міграцію зон у порівнянні з попередніми дослідями, однак рухома фаза на основі ЦПХ все ще забезпечувала більш швидке проходження фронту.

Час проходження фронту розчинника склав:

- для рухомої фази ЦПХ + 2% 1-пропанолу — 34 хвилини;
- для рухомої фази Tween 80 + 2% 1-пропанолу — 1 година 31 хвилина.

Після завершення хроматографування пластинки було вилучено з камер і висушено при лабораторній температурі. Для візуалізації зон розділення пластинки обприскували розчином нінгідрину, після чого поміщали у сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C. Після обробки результати спостерігали візуально та фіксували фотодокументально (рисунок 2.5.).

На представлених хроматограмах проаналізовано вплив введення 2% 1-пропанолу до складу рухомих фаз на міграцію прегабаліну.

Ліва пластинка — ЦПХ + 2% 1-пропанолу:

Добре виражені плями для стандартного зразка прегабаліну (PL) та субстанції (Test), обидві мають чіткі контури та інтенсивне фіолетове забарвлення після обробки нінгідрином. Відстань міграції обох плям приблизно однакова, що свідчить про відповідність субстанції

до стандартного зразка. Форма плям правильна, розмиття по контуру не спостерігається, що вказує на гарну стабільність фронту рухомої фази.

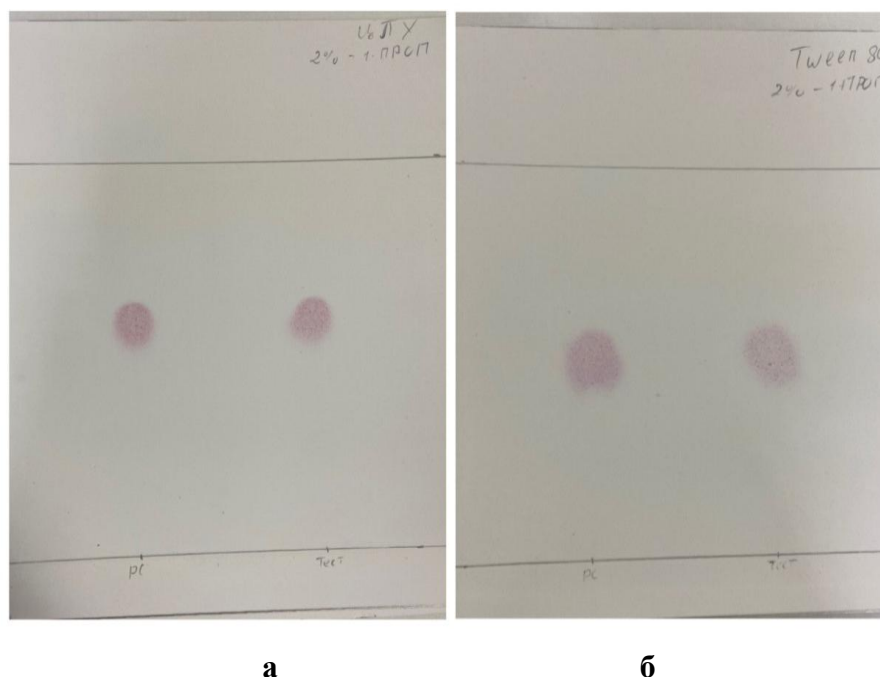


Рисунок 2.5. Результати тонкошарової хроматографії із додаванням 2% 1-пропанолу: а — рідка фаза ЦПХ; б — рідка фаза Tween 80

Права пластинка — Tween 80 + 2% 1-пропанолу:

Плями стандартного зразка (PL) та субстанції (Test) також мають виразне фіолетове забарвлення, однак контури менш чіткі, спостерігається деяка дифузія. Розміщення плям дещо нижче в порівнянні з пластинкою ЦПХ, що свідчить про повільніше мігрування речовини в системі на основі Tween 80, навіть за умови додавання 2% 1-пропанолу. Незначне розмиття плям вказує на більшу полярність та в'язкість рухомої фази Tween 80, яка перешкоджає швидкому переносу аналітів. Введення 2% 1-пропанолу сприяє покращенню рухливості речовин у обох рухомих фазах, однак рухома фаза на основі ЦПХ забезпечує кращі результати розділення та більш чіткі зони забарвлення.

Фронт рухомої фази в системі з ЦПХ проходив швидше, а зона прегабаліну проявлялась чіткіше, що вказує на ефективніший розподіл при використанні цієї рухомої фази.

Методика проявлення нінгідрином підтвердила наявність прегабаліну як у стандартному зразку, так і у субстанції.

Пластинка з рухомою фазою ЦПХ + 2% 1-пропанолу:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,64$

Субстанція (Test): $R_f = 0,64$

Пластинка з рухомою фазою Tween 80 + 2% 1-пропанолу:

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,62$

Субстанція (Test): $R_f = 0,63$

Отримані результати показують, що збільшення концентрації 1-пропанолу до 2% сприяє суттєвому підвищенню значень R_f порівняно з попередніми дослідями (таблиця 2.2). Це свідчить про покращення міграції речовин і більш ефективне розділення.

Таблиця 2.2. Порівняння результатів хроматографії при модифікації рухомої фази 1-пропанолом

Параметр	1% 1-пропанол	2% 1-пропанол
Рухома фаза (ЦПХ)	$R_f = 0,64$	$R_f = 0,64$
Рухома фаза (Tween 80)	$R_f = 0,62$	$R_f = 0,62-0,63$
Час проходження фронту (ЦПХ)	37 хв	34 хв
Час проходження фронту (Tween 80)	1 год 33 хв	1 год 31 хв
Характеристика зон (ЦПХ)	Чіткі, інтенсивні плями	Чіткі, інтенсивні плями
Характеристика зон (Tween 80)	Менш чіткі, легка дифузія	Менш чіткі, легка дифузія
Загальний висновок	Помірне покращення міграції	Максимальне покращення міграції

Висновок до порівняльного дослідження впливу концентрації 1-пропанолу на хроматографічне розділення:

У результаті дослідження встановлено, що введення 1-пропанолу до складу рухомих фаз позитивно впливає на покращення міграції прегабаліну в системі тонкошарової хроматографії.

Збільшення концентрації 1-пропанолу з 1% до 2% призвело до таких результатів:

- зростання значень фактора утримування (R_f) як для стандартного зразка прегабаліну, так і для субстанції;
- скорочення часу проходження фронту рухомої фази, зокрема у системі на основі ЦПХ;
- поліпшення чіткості та інтенсивності зон детекції при застосуванні ЦПХ.

Незважаючи на покращення міграції в системі Tween 80 при підвищенні концентрації 1-пропанолу, її роздільна здатність та швидкість переміщення фронту залишаються нижчими, ніж у системі на основі ЦПХ.

Таким чином, оптимальними умовами для якісного та швидкого хроматографічного аналізу прегабаліну є використання рухомої фази на основі ЦПХ з додаванням 2% 1-пропанолу.

2.7 Визначення фактора утримування (R_f) та інтерпретація хроматографічних даних. Модернізація 2% - 1-пропанолом. Аналіз зразків препарату «Лірика» та модельної системи з домішками

Після попередніх досліджень було виявлено, що застосування рухомої фази, що містить ЦПХ, забезпечує швидке просування фронту розчинника та покращує міграцію субстанцій у порівнянні з Tween 80. Тому для фінального аналізу вирішено зберегти концентрацію 1-пропанолу на рівні 2% та продовжити дослідження з ЦПХ.

Для проведення аналізу було підготовлено одну хроматографічну пластинку розміром 13×15 см, вкриту шаром сорбенту TLC Silica gel 60. Від нижнього краю пластинки було відступлено 1,5 см, а висота фронту розчинника встановлена на 10 см (рисунок 2.6).

На лінії старту було нанесено п'ять проб:

- РЛ — стандартний зразок прегабаліну;
- Лакт — розчин лактози моногідрату;
- Крох — розчин крохмалю кукурудзяного;
- Лірика — розчин оригінального препарату «Лірика»;
- Штуч — модельна суміш з домішками, ідентична за складом оригінальній капсулі.

Нанесення здійснювали мікрошприцем у кількості 10 мкл кожної проби. Для прискорення висихання нанесених плям використовували лабораторну грушу.

Заздалегідь було підготовлено хроматографічну камеру з рухомою фазою ЦПХ + 2% 1-пропанолу, температура середовища становила $21,1^\circ\text{C}$. Об'єм рухомої фази складав 15 мл, що не перевищувало рівень стартової лінії. Після розміщення пластинки в камері розпочато хроматографування.

Спостереження за ходом хроматографування:

- фронт рухомої фази досяг контрольної позначки за 35 хвилин, що підтверджує стабільність і хороші міграційні властивості обраної системи;

- візуально спостерігалось чітке переміщення зон нанесених речовин, особливо для стандартного зразка прегабаліну та препарату «Лірика».

По закінченню хроматографування пластинку було вийнято з камери та висушено при лабораторній температурі. Для візуалізації зон розділення пластинку обприскуємо розчином нінгідрину та поміщаємо у сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C. Після обробки результат зафіксовано фотодокументально (рисунок 2.6).

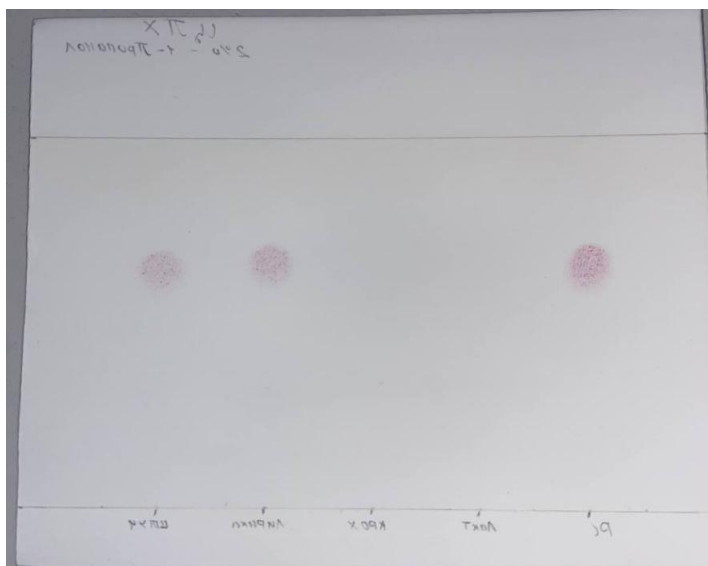


Рисунок 2.6. Результати тонкошарової хроматографії

Розраховані значення R_f :

Стандартний зразок прегабаліну (PL): $R_f = 0,80$

Оригінальний препарат «Лірика»: $R_f = 0,78$

Модельна суміш з домішками (Штуч): $R_f = 0,79$

Отримані значення R_f свідчать про високу ідентичність зон міграції між стандартним зразком прегабаліну, препаратом «Лірика» та модельною сумішшю. Це підтверджує наявність прегабаліну в досліджуваних зразках і демонструє точність підготовки модельної системи, яка відтворює склад оригінального препарату.

Водночас, допоміжні речовини — лактоза моногідрат і крохмаль кукурудзяний — не виявляли зон детекції, що свідчить про їхню відсутність взаємодії з реагентом та відсутність перешкод у процесі ідентифікації прегабаліну.

Таким чином, розроблена методика дозволяє чітко ідентифікувати прегабалін у присутності допоміжних речовин, що підтверджує її селективність та ефективність для аналізу складних лікарських форм (таблиця 2.3).

Таблиця 2.3. Склад рухомих фаз, час хроматографування і форма отриманої хроматографічної плями

№	Рухома фаза	Додаток	Час проходження фронту	Форма плями	Коментар
1	ЦПХ	–	43 хв	округла, чітка	повільне елюювання
2	Tween 80	–	1 год 36 хв	розмита	низька швидкість руху фаз
3	ЦПХ	1% 1-пропанол	37 хв	концентрована	покращення руху, підвищення R_f
4	Tween 80	1% 1-пропанол	1 год 33 хв	широка, бліда	неефективна фаза
5	ЦПХ	2% 1-пропанол	34–35 хв	насичена, чітка	найкращий результат, висока відтворюваність
6	ЦПХ	2% 1-пропанол	35 хв	насичена, чітка	дослід з одночасним нанесенням 5 проб
7	ЦПХ	2% 1-пропанол	35 хв	розширена (смуга)	спостереження з нанесенням у вигляді смуг
8	Tween 80	2% 1-пропанол	1 год 31 хв	насичена, чітка	ефект покращення міграції, але нижча ефективність ніж у ЦПХ

2.8 Порівняльний аналіз способів нанесення проб у ТШХ

На завершальному етапі було вирішено проаналізувати вплив форми нанесення проб на результат хроматографічного розділення. Замість стандартної практики нанесення точкових проб, було використано суцільну смугу довжиною 1 см. Цей експеримент мав на меті з'ясувати, чи впливає ширина нанесення проб на чіткість та ефективність розділення.

Рухома фаза залишалася незмінною — ЦПХ з додаванням 2% 1-пропанолу, оскільки саме ця система виявила найкращі результати в попередніх дослідженнях, забезпечуючи швидке проходження фронту та ефективне розділення.

Для експерименту було підготовлено одну хроматографічну пластинку розміром 13 × 15 см, вкриту сорбентом TLC Silica gel 60. Від нижнього краю пластинки було відступлено 1,5 см, а висота фронту розчинника встановлена на 10 см.

На лінії старту методом нанесення суцільної смуги довжиною 1 см було внесено такі проби:

- PL — стандартний зразок прегабаліну;
- Лакт — розчин лактози моногідрату;
- Крох — розчин крохмалю кукурудзяного;
- Лірика — розчин препарату «Лірика»;
- Штуч — модельна суміш домішок відповідно до складу оригінальної капсули.

капсули.

Кожну пробу наносили в об'ємі 10 мкл за допомогою мікрошприця, рівномірно розподіляючи її вздовж контрольної смуги. Для прискорення висихання використовували лабораторну грушу.

Хроматографічну камеру заздалегідь заповнили рухомою фазою в об'ємі 15 мл, що не перевищував рівень стартової лінії. Температура середовища під час проведення досліді складала 21,1°C.

Спостереження за ходом хроматографування:

- фронт рухомої фази пройшов встановлену контрольну відстань за 37 хвилин, що свідчить про стабільні властивості рухомої фази навіть при зміні способу нанесення проб;
- спостерігалось чітке переміщення зон у вигляді широких, рівномірно забарвлених смуг.

Після завершення хроматографування пластинку висушували при лабораторній температурі, обробляли розчином нінгідрину та поміщали у сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C. Після обробки результати спостерігали візуально та фіксували фотодокументально (рисунок 2.7.).

Розраховані значення R_f :

СЗ Прегабаліну (PL): $R_f = 0,64$

Оригінальний препарат «Лірика»: $R_f = 0,62$

Модельна суміш (Штуч): $R_f = 0,63$

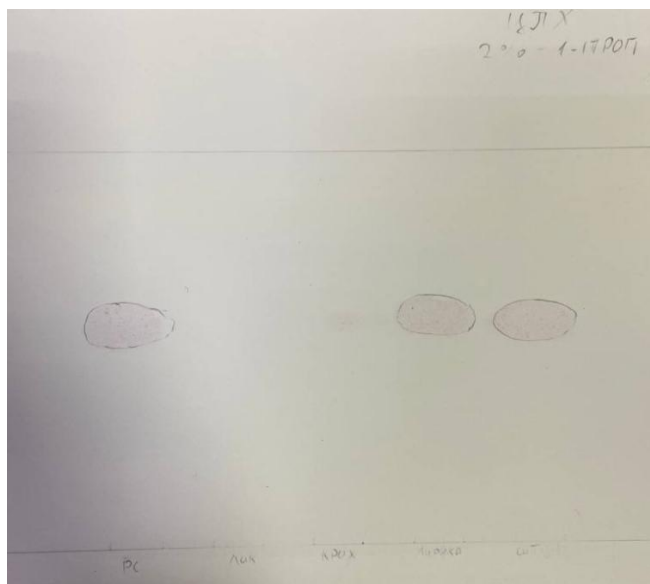


Рисунок 2.7. Результати тонкошарової хроматографії (у вигляді суцільної смуги довжиною 1 см)

Під час експериментальної фази та аналізу результатів хроматографічного розділення, застосованого з різними способами нанесення проб, було виявлено, що незважаючи на рівномірність забарвлення зон при смуговій методиці нанесення, кращі результати досягнуто при точковому нанесенні.

Використання точкового нанесення забезпечувало більшу локальну насиченість забарвлення, чіткіші очертання зон, що сприяло більш точній візуальній ідентифікації та обчисленню хроматографічних показників, особливо фактору утримання (R_f).

Внаслідок цього, для подальших досліджень та практичного впровадження методу, було визначено його перевагу саме як інструменту, який забезпечує високу аналітичну достовірність та точність визначення прегабаліну.

2.9 Загальний аналіз та інтерпретація результатів дослідження

З метою остаточного підтвердження ефективності розробленої методики ідентифікації прегабаліну методом тонкошарової хроматографії було проведено фінальний дослід, який узагальнює ключові спостереження попередніх експериментів.

У ході роботи було встановлено, що введення 1-пропанолу до складу міцелярної рухомої фази покращує її елюючі властивості. Зокрема, концентрація 2% 1-пропанолу у фазі на основі цетилпіридинію хлориду (ЦПХ) забезпечила оптимальне поєднання швидкості фронту та чіткості зон. Рухома фаза на основі Tween 80 виявилася менш ефективною за цими

параметрами, тому остаточний аналіз було вирішено проводити саме на основі системи ЦПХ (рисунок 2.8, таблиця 2.4).

Для проведення досліду було підготовлено одну хроматографічну пластинку розміром 13×15 см, покриту сорбентом TLC Silica gel 60. Від нижнього краю пластинки зроблено відступ 1,5 см, висота фронту рухомої фази становила 10 см.

На стартову лінію точковим способом нанесено п'ять проб:

- PL — стандартний зразок прегабаліну;
- Лакт — розчин лактози моногідрату;
- Крох — розчин крохмалю кукурудзяного;
- Лірика — розчин оригінального препарату;
- Штуч — модельна суміш з домішками, складена відповідно до формули капсули.

За допомогою мікрошприця наносимо проби об'ємом 10 мкл, після чого пластинку залишаємо до повного висихання, прискорюючи процес лабораторною грушею. Камеру попередньо заповнили рухомою фазою ЦПХ + 2% 1-пропанолу у кількості 15 мл, температура середовища становила $21,1^{\circ}\text{C}$. Хроматографування тривало до моменту досягнення фронтом розчинника контрольної мітки; час проходження становив 35 хвилин.

Після вилучення пластинку висушили при кімнатній температурі, обробили розчином нінгідрину, а далі помістили в сушильну шафу на 2 хвилини при температурі 105°C .

Розраховані значення R_f наданої хроматограми:

- PL (стандартний зразок прегабаліну): $R_f = 0,68$
- Лірика (оригінальний препарат): $R_f = 0,66$
- Штуч (модельна суміш з домішками): $R_f = 0,67$

Спостереження:

- Отримано чіткі, насичено забарвлені зони для стандартного зразка, препарату «Лірика» та модельної суміші.
- Для лактози і крохмалю зон детекції не спостерігалось, що підтверджує відсутність впливу допоміжних речовин на результати ідентифікації.
- Чіткість плям при точковому нанесенні виявилася вищою, ніж у попередньому досліді зі смуговим нанесенням, що вказує на кращу концентрацію аналіту і точнішу візуалізацію (рисунок 2.8.).

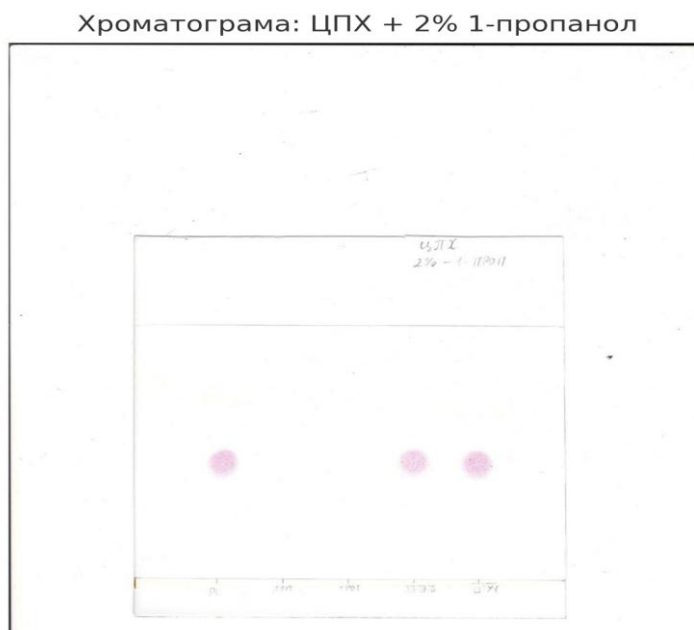


Рисунок 2.8. Результати тонкошарової хроматографії (узагальнюючий результат)

Таблиця 2.4. Загальна таблиця значень R_f прегабаліну (ЦПХ + Tween 80)

№	Рухома фаза	Органічний модифікатор	Тип нанесення	Час фронту	R_f (СЗ)	R_f (Субстанція)	R_f (Штучна модель)	R_f (Лірика)
1	ЦПХ 0.02 моль/л	Немає	Точкове	43 хв	0.66	0.66	0.67	0.66
2	ЦПХ + 1% 1- пропанол	Є	Точкове	37 хв	0.68	0.68	0.67	0.66
3	ЦПХ + 2% 1- пропанол	Є	Точкове	35 хв	0.68	0.68	0.67	0.66
4	ЦПХ + 2% 1- пропанол	Є	Смугове	35 хв	0.67	0.67	0.67	0.66
5	Tween 80 0.02 моль/л	Немає	Точкове	1 год 36 хв	0.57	0.57	0.56	0.56
6	Tween 80 + 1% 1- пропанол	Є	Точкове	1 год 33 хв	0.59	0.58	0.57	0.57
7	Tween 80 + 2% 1- пропанол	Є	Точкове	1 год 31 хв	0.60	0.60	0.59	0.58

У процесі виконання дипломної роботи було здійснено всебічний аналіз можливостей застосування методу міцелярної тонкошарової хроматографії (МТШХ) для ідентифікації прегабаліну у присутності допоміжних речовин. Детально досліджені різні параметри хроматографування, включаючи використання різноманітних рухомих фаз, методики нанесення проб, виявлення хроматографічних зон та підходи до підвищення ефективності розділення.

На початковому етапі дослідження було проаналізовано поведінку прегабаліну в класичних системах рухомих фаз, до складу яких входили неіонні поверхнево-активні речовини (ПАР), зокрема цетилпіридиній хлорид (ЦПХ) і Tween 80 (таблиця 2.4). Результати свідчать, що система з Tween 80 характеризується повільнішою швидкістю елюювання та часом проходження фронту понад 1 годину 30 хвилин. Натомість використання ЦПХ дозволяє досягти стабільного та значно швидшого руху фронту в межах 34–37 хвилин.

Дослідження щодо оптимізації складу рухомих фаз включали серію експериментів з додаванням 1% та 2% 1-пропанолу як органічного модифікатора. Аналіз отриманих даних продемонстрував, що додавання 1-пропанолу сприяє збільшенню значень R_f прегабаліну до 0,68, покращуючи його міграцію при збереженні селективності методу. Найкращі результати були досягнуті в системі з ЦПХ та 2% 1-пропанолу, яка забезпечувала чітке, концентроване формування плям із високими значеннями R_f , що відповідали характеристикам зразків.

Також було оцінено вплив методики нанесення проб на результати хроматографічного дослідження. Застосування смугового нанесення довжиною 1 см забезпечувало рівномірність хроматографічних зон, проте призводило до послаблення інтенсивності їхнього забарвлення, що ускладнювало візуальну оцінку аналіту. Перевагу отримало точкове нанесення, яке забезпечувало вищу концентрацію аналіту в зоні нанесення і сприяло поліпшенню чіткості ідентифікації прегабаліну. Таким чином, для фінального етапу дослідження було обране точкове нанесення як метод із підвищеною точністю та відтворюваністю.

Хроматографічне порівняння охоплювало такі зразки: стандартний зразок прегабаліну, розчин препарату «Лірика», модельну суміш із домішками (лактоза моногідрат, кукурудзяний крохмаль), а також окремі розчини допоміжних речовин.

Результати експериментів показали чітку відповідність зон препарату «Лірика» та модельної суміші до стандартного зразка прегабаліну. Визначені значення R_f знаходилися у межах 0,66–0,68, що підтверджує наявність основної діючої речовини у всіх трьох зразках.

Таким чином, розроблена методика на основі МТШХ із використанням ЦПХ та 2% 1-пропанолу й точкового нанесення проб довела свою оптимальність для ідентифікації прегабаліну. Її ключовими перевагами є висока селективність, швидкість аналізу,

стабільність параметрів R_f , візуальна чіткість хроматографічних зон і відсутність впливу допоміжних речовин на результати дослідження.

Отже, результати проведеного дослідження повністю відповідають поставленим цілям і можуть слугувати основою для подальших наукових розвідок, спрямованих на ідентифікацію прегабаліну у складних фармацевтичних матрицях. Запропонована методика характеризується простотою застосування, відтворюваністю результатів та значною аналітичною надійністю.

ВИСНОВКИ

1. Розроблено методику використання міцелярної тонкошарової хроматографії для ідентифікації прегабаліну в присутності допоміжних речовин із застосуванням рухомих фаз на основі ЦПХ та Tween 80, а також з використанням 1% і 2% розчинів 1-пропанолу.
2. Показано ефективність використання міцелярної тонкошарової хроматографії для виявлення прегабаліну у готових лікарських засобах.
3. Проведено систематичний аналіз різних умов хроматографування, включаючи варіації у виборі рухомих фаз, методиках нанесення проб, способах візуалізації зон та підходах до покращення ефективності розділення.
4. Установлено, що додавання 1-пропанолу до рухомої фази суттєво підвищує якість розділення компонентів і стабільність значень фактору утримування (R_f), забезпечуючи чітку візуалізацію зон на хроматографічній пластинці.
5. Запропонована методика може стати перспективним інструментом для експрес-контролю якості лікарських форм, що містять діючу речовину прегабалін, для подальшого впровадження на підприємстві ПРАТ «Хімфармзавод «Червона зірка».

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Дьяків І. Д., Михайлова І. В., Головкін І. А. Теоретичні основи хроматографії. КНУ: Київ, 2017, с 232.
2. Судак В. П., Мельник О. Ю. Тонкошарова хроматографія у фармацевтичному аналізі. Видавничий центр ЛНМУ: Львів, 2015, с 118.
3. Sharma B. K. Instrumental Methods of Chemical Analysis. Goel Publishing House, Krishna Prakashan Media Ltd.: Meerut, 2014, p 810.
4. ICH Harmonised Tripartite Guideline Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005, p 13.
5. Fattahi A., Bahrami G. Determination of pregabalin in human plasma using HPTLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **2016**, 129, 415–419.
6. Мазур І. А., Хомченко І. В. Аналітична хімія. Практикум. ХНУ імені В.Н. Каразіна: Харків, 2018, с 128.
7. Dědina J., Barták P. Modern Methods of Pharmaceutical Analysis. Springer, 2020.
8. Абдуллаєв Ф. А., Самсонова Н. В. Фармацевтичний аналіз. Практикум. Медицина: Київ, 2016, с 224.
9. Маркін М. І., Кузьменко А. М. Фізико-хімічні методи аналізу в хімії та фармації. Нова книга: Вінниця, 2019, с 280.
10. Koenigbauer M.J. Application of micellar mobile phases for the assay of drugs in biological fluids. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. **1990**, 531, 79-99.
11. Офіційний сайт ЕМА (European Medicines Agency): інформаційний листок для фахівців щодо препарату «Lyrica» (Pregabalin). www.ema.europa.eu.
12. Офіційний сайт FDA (Food and Drug Administration): Pregabalin Drug Summary. www.fda.gov.
13. Harkhani H., Thummar K., Chauhan S., Vadalía J. HPTLC Method Development and Validation for the Simultaneous Estimation of Nortriptyline HCl and Pregabalin in their Combined Dosage Form. *Journal of Chromatographic Science*. **2024**, 62(9), 886–891.
14. Haque SK M., Abu-Judeh A., Jain R., Kabir A., Greener spectrophotometric and HPLC investigation of CNS agent pregabalin: Taguchi model and box-behnken design for method parameters optimization. *Journal of Molecular Structure*. **2024**. 1317, 139143.
15. Naguib I.A., Ali N.A., Elroby F.A., Elghobashy M.R. Green HPLC–DAD and HPTLC Methods for Quantitative Determination of Binary Mixture of Pregabalin and

Amitriptyline Used for Neuropathic Pain Management. *Journal of Chromatographic Science*. **2021**, 59(6), 536–547.

16. Ghogare Jyoti D., Panchal Pranita P., Rathod Sayali P., Jadhao U.T. Stability Indicating HPTLC Method Development and Validation for Estimation of Nortriptyline and Pregabalin in Tablet Dosage Form. *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. **2023**, 13(1), 21-29.

17. Shah J., Kotadiya R. A Critical Review on Analytical Methods for Recently Approved FDC Drugs: Pregabalin and Etoricoxib. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2020**, 52(5), 1048–1068.

18. Abbas S., Abdou R.H., Mahmoud S.M., Waleed F., Elhady K.A. Hair as a Medicolegal Evidence in Detection of Cannabis and Pregabalin residues. *Journal of Advanced Veterinary Research*. **2024**, 13(10), 2095-2101.

19. Kritikos N., Iliou A., Kalampaliki A.D., Gikas E., Kostakis I.K., Michel B.Y., Dotsikas Y. Chemometrically Assisted Optimization of Pregabalin Fluorescent Derivatization Reaction with a Novel Xanthone Analogue and Validation of the Method for the Determination of Pregabalin in Bulk via a Plate Reader. *Molecules*. **2022**, 27, 1954.

20. Seema A., Jeeja P., Ashish J. Development and Validation of HPLC Method for Estimation of Pregabalin in Bulk & Capsule Dosage Form. *Pharm Anal Acta*. **2016**, 7(492), 2.

21. Gupta C., Puri R., Hussain A., Jain S.K. Development and Validation of Ninhydrin Based Colorimetric Spectrophotometric Assay for Determination of Pregabalin in Different Dissolution Mediums. *Eurasian J. Anal. Chem*. **2012**, 8, 90-98.

22. Gujral R.S., Haque S.M., Kumar S. A novel method for the determination of pregabalin in bulk pharmaceutical formulations and human urine samples. *Afr. J. Pharm. Pharmacol*. **2009**, 3(6), 327-334.

23. Shah D.A., Patelia E.M., Mori A. Simultaneous estimation of pregabalin and methylcobalamine in pharmaceutical formulation by HPTLC-densitometry method. *Journal of Chromatography and Separation Techniques*. **2013**, 4, 145-152.

24. Sneha P., Srinivas P. Stability indicating assay method development and validation of pregabalin in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *Indo-American journal of pharmaceutical sciences*. **2015**, 2(6), 1038-1047.

25. More S., Tamboli A., Amol V., Patil S. HPTLC method development for the simultaneous determination of Pregabalin and Amitriptyline hydrochloride in pharmaceutical dosage forms. *JDDT*. **2019**, 9(2-s), 348-354.

26. Prajapati P., Pulusu V.S., Shah S. Design of experiments and white analytical chemistry-driven green and sensitive spectrofluorimetric estimation of pregabalin in its pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. **2024**, 10(1), 43.
27. Bali A., Gaur P. A novel method for spectrophotometric determination of pregabalin in pure form and in capsules. *Chemistry Central Journal*. **2011**, 5, 1-7.
28. Armağan, Ö. Development and validation of selective spectrophotometric methods for the determination of pregabalin in pharmaceutical preparation. *Chinese journal of chemistry*. **2009**, 27(4), 781-786.
29. Walash M.I., Belal F., El-Enany N., El-Maghrabey M.H. Simple and sensitive spectrofluorimetric method for the determination of pregabalin in capsules through derivatization with fluorescamine. *Luminescence*. **2011**, 26(5), 342-348.
30. Mohammad A., Ullah Q., Khan M., Aziz S.S., Rahman P.F., Mohammad F. Detection reagents used in on-plate identification of amino acids by thin layer chromatography: A review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. **2018**, 41(10), 595–603.
31. Mohammadian E., Rahimpour E., Foroumadi A., Alizadeh-Sani M., Hasanvand Z., Jouyban A. Derivatization of γ -Amino Butyric Acid Analogues for Their Determination in the Biological Samples and Pharmaceutical Preparations: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. **2021**, 52(8), 1727–1754.
32. Prasad M.K.C., Sagar G.V., Sudhakar R.D.P. Simultaneous HPTLC method for estimation of gabapentin and pregabalin. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **2013**, 5, 326-333.
33. Arayne M.S., Shahnaz H., Ali A., Sultana N. Monitoring of Pregabalin in pharmaceutical formulations and human serum using UV and RP-HPLC techniques: Application to dissolution test method. *Pharm. Anal. Acta*. **2014**, 5(287), 2.
34. Kasawar G.B., Farooqui M.N. Development and validation of HPLC method for the determination of pregabalin in capsules. *Indian. J. Pharm. Sci.* **2010**, 72(4), 517-519.
35. Akther H., Morshed M.M., Islam M.M., Hassan M.J., Barua B.P., Emran T.B. Development of a Method and its Validation for Estimation of Pregabalin in Pharmaceutical and Bulk Formulation. *Biomed. Sci. Today*. **2015**, 2(10), 1-8.
36. Mutalabisin F., Helaluddin A.B.M., Sengupta P., Mohamed F., Chatterjee B. Quantitation of pregabalin by HPLC-UV method using ninhydrin derivatization: development and validation. *Current Pharmaceutical Analysis*. **2021**, 17(1), 165-171.

37. Martinc B., Grabnar I., Mrhar A., Vovk T. Rapid High-Performance Liquid Chromatography Method for Determination of Pregabalin in a Pharmaceutical Dosage Form Following Derivatization with Fluorescamine. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*. **2010**, 93(4), 1069–1076.