https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229
УДК 615.03

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ

Т. Н. Комаров[1]✉, П. К. Карнакова[1], О. А. Арчакова[1], Д. С. Щелгачева[1], Н. С. Багаева[1], И. Е. Шохин[1], К. Я. Заславская[2], П. А. Белый[2]

[1] ООО «Центр Фармацевтической Аналитики» (ООО «ЦФА»), 117246, Россия, г. Москва, Научный пр., д. 20, стр. 3
[2] ООО «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, пр-т Мира, д. 13 стр. 1

✉ **Контактное лицо:** Комаров Тимофей Николаевич. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; П. К. Карнакова – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
О. А. Арчакова – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Д. С. Щелгачева – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001;
Н. С. Багаева – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; И. Е. Шохин – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630;
К. Я. Заславская – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; П. А. Белый – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Статья поступила: 07.06.2022 **Статья принята в печать:** 22.08.2022 **Статья опубликована:** 25.08.2022

Резюме

Введение. Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (Coronavirus Disease 2019) – это острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Фавипиравир – синтетический противовирусный препарат, применяемый для этиотропной терапии COVID-19. Выпускается в лекарственных формах для перорального и парентерального введения, при этом парентеральный путь введения фавипиравира имеет ряд преимуществ перед пероральным. Разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования препарата фавипиравира для парентерального введения в виде инфузий, изучения его фармакокинетических параметров и выбора оптимальных доз препарата.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с использованием с использованием ультрафиолетового детектора (ВЭЖХ-УФ) для дальнейшего изучения фармакокинетики.

Материалы и методы. Определение фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-УФ при длине волны 323 ± 2 нм. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения метанолом. Внутренний стандарт: ралтегравир. Подвижная фаза: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08%-го аммиака (элюент А); 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08%-го аммиака (элюент В). Колонка: Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 0,25–200,00 мкг/мл.

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения, перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита и внутреннего стандарта; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке аналита; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Заключение. Разработана и валидирована методика определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов фавипиравира

Ключевые слова: фавипиравир, COVID-19, плазма, ВЭЖХ-УФ, валидация, фармакокинетика

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Т. Н. Комаров, О. А. Арчакова, Д. С. Щелгачева, П. К. Карнакова, участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. Н. С. Багаева проводила статистическую обработку данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый отвечали за организационную часть исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):220–229. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229

Development and Validation of HPLC-UV Method for the Determination of Favipiravir in Human Plasma

Timofey N. Komarov[1]✉, Polina K. Karnakova[1], Olga A. Archakova[1], Dana S. Shchelgacheva[1], Natalia S. Bagaeva[1], Igor E. Shohin[1], Kira Ya. Zaslavskaya[2], Petr A. Bely[2]

[1] LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia
[2] LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ **Corresponding author:** Timofey N. Komarov. **E-mail:** t.komarov@cpha.ru

© Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2022
© Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2022

ORCID: Timofey N. Komarov – https://orcid.org/0000-0001-8354-7877; Polina K. Karnakova – https://orcid.org/0000-0002-7518-0777;
Olga A. Archakova – https://orcid.org/0000-0001-6621-1060; Dana S. Shchelgacheva – https://orcid.org/0000-0003-4894-7001;
Natalia S. Bagaeva – https://orcid.org/0000-0001-7496-8186; Igor E. Shohin – https://orcid.org/0000-0002-1185-8630;
Kira Ya. Zaslavskaya – https://orcid.org/0000-0002-7348-9412; Petr A. Bely – https://orcid.org/0000-0001-5998-4874.

Received: 07.06.2022 **Revised:** 22.08.2022 **Published:** 25.08.2022

Abstract

Introduction. Coronavirus disease (COVID-19) is an acute infectious disease caused by SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Favipiravir is a synthetic prodrug with antiviral activity used for the treatment of COVID-19. There are oral and parenteral dosage forms of favipiravir. Compared with oral administration, parenteral administration has some advantages. Developing a method for the determination of favipiravir in human blood plasma is necessary for performing the analytical part of clinical studies of favipiravir for parenteral administration as an infusion, studying pharmacokinetics, and choosing the optimal dosage of the drug.

Aim. The aim of this study is to develop and validate a method for quantitative determination of favipiravir in human plasma by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) for pharmacokinetic studies.

Materials and methods. Determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. The UV detection was set at 323 ± 2 nm. The samples were processed by methanol protein precipitation. Internal standard: raltegravir. Mobile phase: 0.1 % formic acid in water with 0.08 % aqueous ammonia (eluent A), 0.1 % formic acid in acetonitrile with 0.08 % aqueous ammonia (eluent B). Column: Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4.6 mm, 5 µm. Analytical range: 0.25–200.00 µg/mL.

Results and discussion. This method was validated by selectivity, calibration curve, accuracy, precision, spike recovery, the lower limit of quantification, carry-over effect and stability.

Conclusion. We developed and validated the method of quantitative determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. The analytical range was 0.25–200.00 µg/mL in human plasma. The method could be applied in pharmacokinetics studies of favipiravir.

Keywords: favipiravir, COVID-19, plasma, HPLC-UV, validation, pharmacokinetics

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Timofey N. Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva, Polina K. Karnakova have developed and validated the analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out statistical processing of the obtained results. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely carried out the organization of work in this direction. All the above authors participated in the discussion of the results in the format of scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A. Determination of favipiravir in human plasma by HPLC-UV. *Drug development & registration*. 2022;11(3):220–229. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – это острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). Данное заболевание, впервые зарегистрированное в Китае в декабре 2019 года, является причиной пандемии COVID-19, продолжающейся во всем мире в настоящее время [1]. Согласно статистическим данным, на август 2022 года в 228 странах мира зафиксировано около 578 млн случаев заражения вирусом SARS-CoV-2, из которых более 6 млн закончились летальным исходом. На территории России на сегодняшний день зарегистрировано более 18,5 млн случаев, а число летальных исходов достигло более 380 тысяч[1].

Появление новых штаммов вируса SARS-CoV-2, снижение темпов вакцинации, а также отмена действующих ранее ограничительных мер и сокращение мероприятий, направленных на снижение темпов распространения новой коронавирусной инфекции, могут провоцировать рост заболеваемости и повышать нагрузку на систему здравоохранения [2]. В настоящее время по всему миру наблюдается распространение штамма «Омикрон» и его разновидностей. Опасность данного штамма и его подштаммов заключается в наличии мутаций, вызывающих повышенную трансмиссивность, а также позволяющих избегать иммунного ответа от вакцин и естественного иммунитета [3, 4].

При лечении COVID-19 рекомендуется назначать пациентам поддерживающую патогенетическую, этиотропную, а также симптоматическую терапию. Согласно последней версии временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции для этиотропной терапии COVID-19 в настоящее время выделяется несколько противовирусных препаратов, в том числе фавипиравир[2].

Фавипиравир – синтетический противовирусный препарат, аналог пуриновой нуклеиновой кислоты, селективный ингибитор РНК-полимеразы, прояв-

[1] WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Available at: https://covid19.who.int/ Accessed: 07.08.2022.

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 17.07.2022.

ляющий активность в отношении широкого спектра различных РНК-содержащих вирусов [5, 6]. В России зарегистрированы препараты фавипиравира для перорального, а также для парентерального введения[1]. Фавипиравир в лекарственной форме таблетки применяется как в амбулаторных, так и в стационарных условиях, а фавипиравир для парентерального применения – только в стационарных условиях и рекомендован пациентам с легким и среднетяжелым течением COVID-19[2]. Фавипиравир для парентерального введения удобен для пациентов, находящихся в отделении интенсивной терапии, а также для пациентов, которые имеют поражения желудочно-кишечного тракта или страдают дисфагией. Парентеральный путь введения имеет высокую биодоступность, а также помогает избежать взаимодействия с пищей и воздействия пищеварительных ферментов [7, 8].

Разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования препарата фавипиравира в виде инфузий в различных дозах, изучения фармакокинетических параметров и выбора оптимальных доз препарата.

В настоящее время в литературных источниках опубликован ряд работ по разработке методик количественного определения фавипиравира с целью проведения фармакокинетических исследований. Для определения фавипиравира в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием (ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV)], с флуориметрическим детектированием (ВЭЖХ-ФЛД) [high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)], с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографией с тандемным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)].

В рассмотренных методиках в качестве пробоподготовки в основном применяется метод жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖЭ), а также осаждение белков плазмы крови органическими растворителями (изопропанолом, метанолом, ацетонитрилом) (таблица 1).

Проанализировав методики количественного определения фавипиравира, представленные в литературных источниках, был сделан вывод об отсутствии методик одновременно с простым способом пробоподготовки и широким аналитическим диапазоном, поэтому было принято решение разработать и валидировать методику, отвечающую данным требованиям, самостоятельно.

Из-за ожидаемых высоких концентраций фавипиравира в плазме крови человека при исследовании инфузионных лекарственных форм с высокими дозировками предпочтительным методом исследования был выбран ВЭЖХ-УФ.

В данном исследовании была приведена разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. В качестве пробоподготовки был выбран способ осаждения белков плазмы крови метанолом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование было проведено на высокоэффективном жидкостном хроматографе LC-2040C (Shimadzu Corporation, Япония) с встроенным УФ-детектором, четырехкомпонентным градиентным насосом низкого давления, дегазатором, автосамплером, термостатом колонок и контроллером. Обработка первичных данных проводилась в программном обеспечении LabSolutions (Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

В работе были использованы следующие реактивы: метанол (класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), ацетонитрил (класс «LC-MS grade», Biosolve, Франция; класс «Ultra Gradient HPLC-grade», J.T. Baker, Нидерланды), муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReac, Испания), аммиак водный (класс «for analysis», PanReac, Испания), вода деминерализованная I класса. Для приготовления исходных стандартных растворов и рабочих стандартных растворов были использованы стандартные образцы фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 100,30 %) и ралтегравира калия (USP reference standard, США, количественное содержание 99,10 %).

Исходный стандартные раствор фавипиравира (ФАВ) [favipiravir (FAV)], и внутреннего стандарта (ВС) ралтегравира (РАЛ) [raltegravir (RAL)] готовили путем растворения точной навески субстанций в ацетонитриле. Рабочие стандартные растворы фавипиравира готовили путем разведения исходных растворов ацетонитрилом до заданных концентраций в плазме крови, соответствующих уровням 1–8, нижнему пределу количественного определения (НПКО) [lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], средним [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2).

[1] ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: https://grls.rosminzdrav.ru/ Ссылка активна на 17.07.2022.

[2] Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 17.07.2022.

Таблица 1. Методики количественного определения фавипиравира

Table 1. Methods of favipiravir quantitative determination

Аналитический метод (источник ионизации; ионизация (+/–), если применимо) Analytical method (ionization source; ionization (+/–) if applicable)	**Объект анализа** Object	**Пробоподготовка** Sample preparation	**Аналитический диапазон** Analytical range	**Ссылка** Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	3,10–60,00 мкг/мл 3.10–60.00 μg/mL	[9]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	25,00–80,00 нг/мл 25.00–80.00 ng/mL	[10]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,20–3,20 мкг/мл 0.20–3.20 μg/mL	[11]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 μg /mL	[12]
ВЭЖХ-ФЛД HPLC-FLD	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков изопропанолом Protein precipitation by isopropanol	40,00–240,00 нг/мл 40.00–240.00 ng/mL	[13]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation by methanol	100,00–20000,00 нг/мл 100.00–20000.00 ng/mL	[14]
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	0,25–16,00 мкг/мл 0.25–16.00 μg/mL	[15]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение белков ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	0,048–50,00 мкг/мл 0.048–50.00 μg/mL	[16]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) HPLC-MS/MS (electrospray; +)			0,062–50,00 мкг/мл 0.062–50.00 μg/mL	

Таблица 2. Концентрации фавипиравира и ралтегравира в калибровочных образцах и образцах контроля качества

Table 2. Concentrations of favipiravir and raltegravir at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	**Концентрация аналита, мкг/мл** Analyte concentration, μg/mL	**Концентрация ВС, мкг/мл** IS concentration, μg/mL
	ФАВ FAV	**РАЛ** RAL
1	0,25	60,00
2	5,00	60,00
3	10,00	60,00
4	25,00	60,00
5	50,00	60,00
6	70,00	60,00
7	90,00	60,00
8	200,00	60,00
LLOQ	0,25	60,00
L	0,75	60,00
M1	40,00	60,00
M2	110,00	60,00
H	160,00	60,00

Образцы интактной плазмы крови человека, а также исходные стандартные растворы и рабочие стандартные растворы хранились в морозильной камере при температуре от –50 °С до –35 °С.

Пробоподготовка

К 200 мкл образца, помещенного в микроцентрифужные пробирки типа «Эппендорф» вместимостью 2 мл, прибавляли 30 мкл рабочего раствора ВС ралтегравира и проводили осаждение 600 мкл метанола. Далее перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд и центрифугировали с ускорением 15 000 g в течение 15 минут. Затем супернатант переносили в хроматографические виалы и помещали в автосамплер хроматографа для последующего анализа.

Условия хроматографического разделения и детектирования

Хроматографическое разделение происходило на колонке Phenomenex Kinetex®, 150 × 4,6 мм, 5 мкм при скорости потока подвижной фазы (ПФ) 1,0 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 10 мкл, температура термостата колонки поддерживалась на уровне 40 °С.

В качестве подвижной фазы использовались:

- *Элюент А*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде с прибавлением 0,08%-го аммиака (по объему).
- *Элюент В*: 0,1%-й раствор муравьиной кислоты, 10%-й раствор воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08%-го аммиака (по объему).

Был использован градиентный режим элюирования, представленный в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %
0,00	96,0	4,0
1,00	96,0	4,0
2,80	85,0	15,0
5,00	0,0	100,0
7,00	0,0	100,0
7,50	96,0	4,0
9,00	96,0	4,0

Время удерживания фавипиравира составило около 3,8 минут, ралтегравира – около 5,5 минут. Общее время регистрации хроматограммы по УФ-детектору составило 9,0 минут.

Детектирование проводили при длине волны 323 ± 2 нм при частоте регистрации сигнала детектора 5 Гц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Особенностью разработки методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ являлся широкий аналитический диапазон.

Длина волны детектирования в пределах 323 ± 2 нм была подобрана на основании данных о спектрах поглощения фавипиравира в УФ-области [17].

Исходя из физико-химических свойств фавипиравира была подобрана хроматографическая колонка Phenomenex Kinetex®, C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. При использовании данной колонки удалось добиться наиболее полного разделения компонентов матрицы.

Ралтегравир был выбран в качестве ВС. Данное вещество схоже с анализируемым веществом по своей структуре и физико-химическим свойствам (таблица 4).

В качестве осадителя был выбран метанол, т. к. при его использовании удалось добиться наиболее полного осаждения белков плазмы крови и получить оптимальную форму хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза[1], а также руководств EMA[2] и FDA[3] по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность и прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО), перенос пробы, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов; краткосрочная («настольная» и «постпрепаративная») и долгосрочная стабильность аналита в матрице; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке).

Селективность

Для оценки данного параметра проводили анализ шести образцов интактной плазмы крови, двух образцов гемолизной интактной плазмы и двух образцов интактной плазмы с повышенным содержанием липидов, а также образцов с прибавлением рабочих стандартных растворов до концентрации фавипиравира 0,25 мкг/мл и рабочего раствора ВС ралтегравира до концентрации 60,00 мкг/мл, что соответствует уровню НПКО (см. таблица 2).

Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 1. Сигналы пиков со временами удерживания, соответствующими временам удерживания фавипиравира и ралтегравира, не превышают 20 % от сигнала фавипиравира на уровне НПКО и 5 % от сигнала ралтегравира соответственно.

Калибровочная кривая

Был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением рабочего раствора ВС ралтегравира до концентрации 60,00 мкг/мл и рабочих стандартных растворов фавипиравира до концентраций в диапазоне 0,25–200,00 мкг/мл, соответствующих уровням 1–8 (см. таблица 2). По полученным значениям концентраций были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика фавипиравира к площади пика ралтегравира от отношения концентрации фавипиравира к концентрации ралтегравира в плазме крови. Калибровочные графики имели линейный вид (рисунок 2). Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в валидационных циклах № 1–3 приведены в таблице 5.

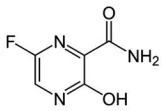
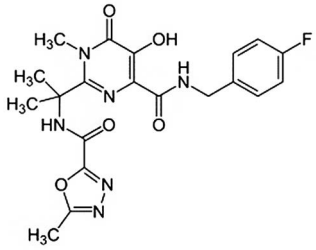
[1] Правила проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза (утверждены решением № 85 Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г.). Доступно по: https://docs.cntd.ru/document/456026107/ Ссылка активна на 17.07.2022.

[2] European Medicines Agency. Available at: https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/ Accessed: 17.07.2022.

[3] Food and Drug Administration. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/ Accessed: 17.07.2022.

Таблица 4. Физико-химические свойства анализируемого вещества и внутреннего стандарта

Table 4. Chemical and physical characteristics of the analyte and of the internal standard

Наименование субстанции Name of substance	**Фавипиравир**[1] Favipiravir[1]	**Ралтегравир**[2] Raltegravir[2]
Рациональное название (ИЮПАК) IUPAC name	6-фторо-3-гидроксипиразин-2-карбоксамид 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide	N-(2-(4-(4-Фторбензилкарбамоил)-5-гидрокси-1-метил-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-2-ил)пропан-2-ил)-5-метил-1,3,4-оксадиазол-2-карбоксамид N-(4-Fluorobenzyl)-5-hydroxy-1-methyl-2-(2-{[(5-methyl-1,3,4-oxadiazol-2-yl)carbonyl]amino}-2-propanyl)-6-oxo-1,6-dihydro-4-pyrimidinecarboxamide
pKa	9,39	7,02
logP	0,49	1,30
Структурная формула Chemical structure		

Примечание. [1] Favipiravir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466/ Ссылка активна на 17.07.2022.
[1] Raltegravir. Drugbank. Доступно по: https://go.drugbank.com/drugs/DB06817/ Ссылка активна на 17.07.2022.

Note. [1] Favipiravir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB12466/ Accessed: 17.07.2022.
[1] Raltegravir. Drugbank. Available at: https://go.drugbank.com/drugs/DB06817/ Accessed: 17.07.2022.

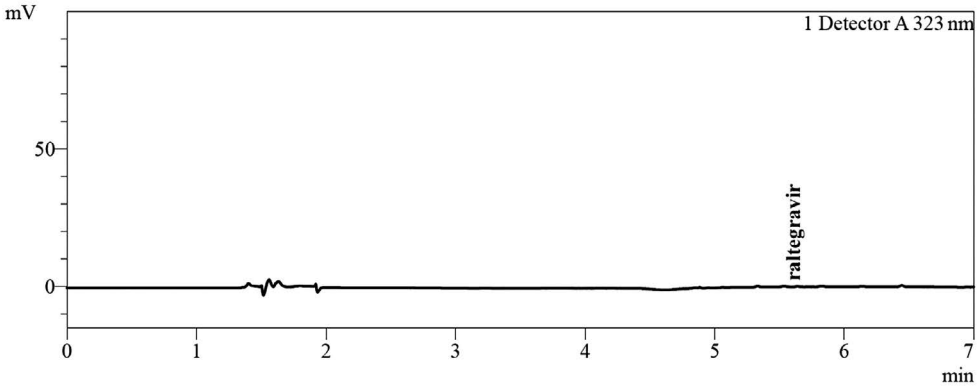


Рисунок 1. Хроматограмма образца интактной плазмы крови

Figure 1. Chromatogram of blank human plasma sample

Полученные значения коэффициентов корреляции составляют более 0,999 и соответствуют нормам. Хроматограмма калибровочного образца на уровне 8 (таблица 2) представлена на рисунке 3.

Таблица 5. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции

Table 5. Calibration equation and correlation coefficients

№	**Уравнение калибровочной кривой** Calibration equation	R
1	$y = 3{,}15469 \cdot x + 0{,}00327657$	0,9990149
2	$y = 3{,}21830 \cdot x + 0{,}00168604$	0,9992910
3	$y = 3{,}26573 \cdot x + 0{,}000615190$	0,9990230

Точность и прецизионность

Для оценки параметров «точность» и «прецизионность» были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и H, с номинальной концентрацией фавипиравира в образцах, равной 0,75 мкг/мл, 40,00 мкг/мл, 110,00 мкг/мл и 160,00 мкг/мл, соответственно, и концентрацией ВС ралтегравира 60,00 мкг/мл (см. таблица 2). Анализировали по пять образцов в рамках трех последовательностей (внутри цикла, между двумя и между тремя циклами). Относительное стандартное отклонение (RSD, %) и от-

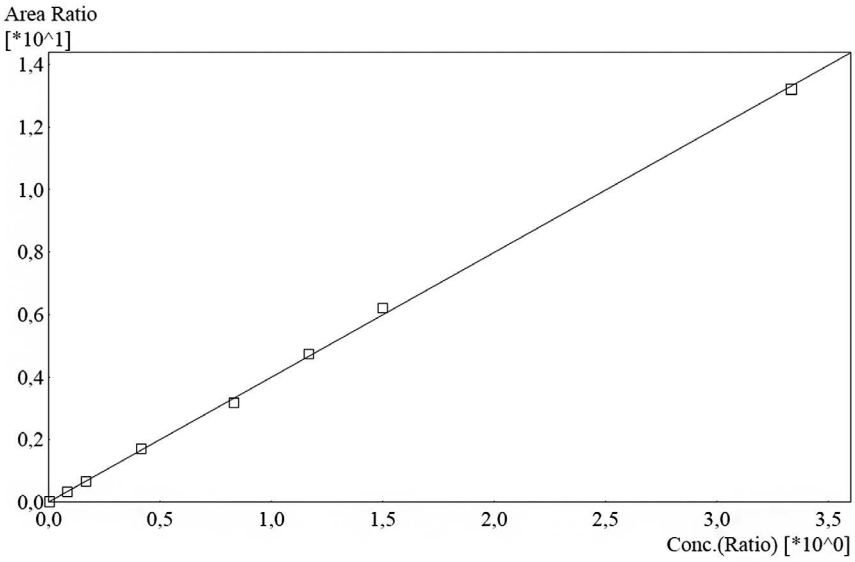


Рисунок 2. **Калибровочный график**

Figure 2. **Calibration curve**

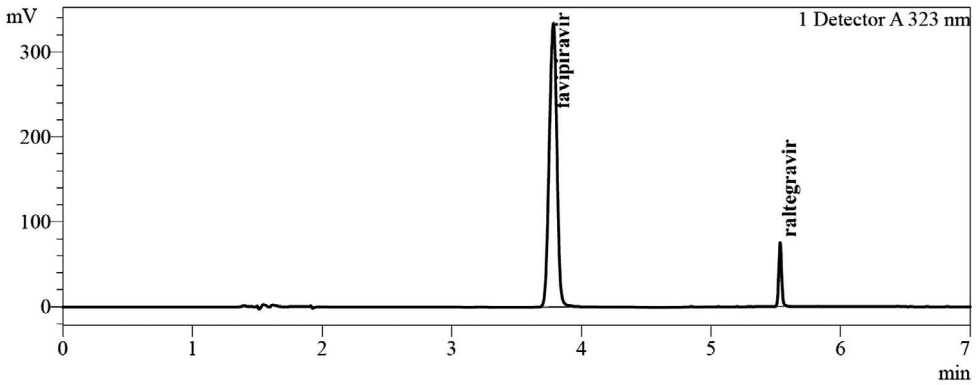


Рисунок 3. **Хроматограмма образца плазмы крови, уровень 8**

Figure 3. **Chromatogram of human blood sample with favipiravir at level 8**

носительная погрешность (E, %), рассчитанные для полученных значений концентраций, соответствуют нормам. Данные представлены в таблице 6.

Степень извлечения

Для оценки параметра «степень извлечения» были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы и интактной плазмы с повышенным содержанием липидов без влияния степени извлечения на уровнях L, M1, M2 и H (таблица 2), а также образцы контроля качества, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки степени извлечения. Среднее значение степени извлечения фавипиравира из различных видов интактных матриц составляет 100,36 %. Относительное стандартное отклонение рассчитанных значений степени извлечения фавипиравира из различных видов интактных матриц не превышает 15 % и соответствует критериям приемлемости. Данные представлены в таблице 7.

Нижний предел количественного определения

Нижний предел количественного определения методики был определен на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. За НПКО методики была принята минимальная концентрация фавипиравира в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количест-

Таблица 6. **Точность и прецизионность методики определения фавипиравира (внутри цикла, между двумя циклами, между тремя циклами)**

Table 6. **Accuracy and precision of favipiravir determination procedure (inter-day, intra-day 1, intra-day 2)**

Введено (мкг/мл) Injected (μg/mL)	RSD, %			E, %		
	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)	(*n* = 5)	(*n* = 10)	(*n* = 15)
0,25	6,09	6,20	6,03	0,97	–2,10	–0,42
0,75	1,24	1,74	5,70	–5,98	–6,16	–2,65
40,00	0,08	5,36	4,90	4,87	–0,20	–1,71
110,00	0,06	1,20	1,39	6,05	7,28	6,55
160,00	0,04	3,02	4,35	5,24	2,30	–0,13

венное определение фавипиравира со значениями относительного стандартного отклонения и относительной погрешности не более 20 %. НПКО фавипиравира в плазме крови человека составил 0,25 мкг/мл. Хроматограмма плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО представлена на рисунке 4.

Таблица 7. **Оценка степени извлечения фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы**

Table 7. **Calculation of favipiravir recovery at levels L, M1, M2, H from the different biological matrix**

Биологическая матрица Biological matrix	Степень извлечения ФАВ, % Recovery FAV, %			
	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	91,12	111,11	98,18	103,97
	93,91	111,14	98,25	103,96
	90,26	111,20	98,18	103,97
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	88,66	104,29	103,68	102,97
	88,74	103,99	103,54	102,94
	85,85	104,01	103,44	103,03
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	91,95	100,62	105,77	102,50
	89,80	100,70	105,42	102,51
	94,70	100,58	105,56	102,42
Среднее Average	100,36			
SD	6,58			
RSD	6,56			

Стабильность

Были проанализированы по три образца для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной стабильности, стабильности при трехкратной заморозке-разморозке, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 112 дней при температуре –50 °С до –35 °С), долгосрочной стабильности (при хранении в течение 112 дней при температуре от –50 °С до –35 °С) аналита на уровнях L и H (таблица 2). Величины относительной погрешности, рассчитанные для полученных значений концентраций, соответствуют критериям приемлемости (таблица 8).

Перенос пробы

Для оценки параметра «перенос пробы» в рамках валидационных циклов № 1–3 был проведен последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. На хроматограммах образцов интактной плазмы крови значения площадей фавипиравира и ралтегравира соответствовали критериям приемлемости.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена разработка и валидация методики количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. Подтверж-

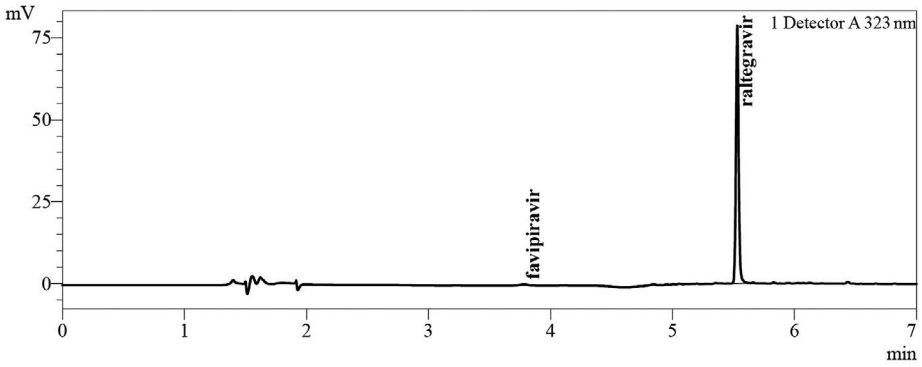


Рисунок 4. **Хроматограмма образца плазмы крови, уровень НПКО**

Figure 4. **LLOQ plasma sample chromatogram**

Таблица 8. **Оценка стабильности**

Table 8. **Stability assessment**

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение E, % Average value of E, %	
		L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	–6,12	6,31
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	48 часов при температуре 4 °C 48 hours at 4 °C	–4,31	–0,70
Стабильность при трехкратной заморозке-разморозке Freeze-thaw stability	36 часа при температуре –42,5 ± 7,5 °C и 6 часов при температуре 20 ± 5°C 36 hours at –42.5±7.5 °C and 6 hours at 20 ± 5 °C	–10,72	–13,31
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–4,88	3,13
Стабильность исходных стандартных растворов Stock solution stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–7,31	–10,67
Стабильность рабочих стандартных растворов Work solution stability	112 дней при температуре –42,5 ± 7,5 °C 112 days at –42.5 ± 7.5 °C	–7,66	–10,58

денный аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл в плазме крови человека. Данный аналитический диапазон позволяют применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований препаратов фавипиравира.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yu Y., Lau M. M., Lau J. T. Application of the protection motivation theory to understand determinants of compliance with the measure of banning gathering size >4 in all public areas for controlling COVID-19 in a Hong Kong Chinese adult general population. *Plos one*. 2022;17(5):e0268336. DOI: 10.1371/journal.pone.0268336.
2. Заплатников А. Л., Бурцева Е. И., Гирина А. А., Свинцицкая В. И., Леписева И. В. Активная специфическая иммунопрофилактика гриппа в условиях пандемии COVID-19 и начало вакцинации против коронавирусной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2. *Педиатрия. Consilium Medicum*. 2020;4:12–16. DOI: 10.26442/26586630.2020.4.200580.
3. Chenchula S., Karunakaran P., Sharma S., Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(7):2969–2976. DOI: 10.1002/jmv.27697.
4. Tseng H. F., Ackerson B. K., Luo Y., Sy L. S., Talarico C. A., Tian Y., Bruxvoort K. J., Tubert J. E., Florea A., Ku J. H., Lee G. S. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Nature Medicine*. 2022;28(5):1063–1071. DOI: 10.1038/s41591-022-01818-y.
5. Zhao L., Zhong W. Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? *The Innovation*. 2021;2(4):100165. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100165.
6. Pavlova V., Hristova S., Uzunova K., Vekov T. A review on the mechanism of action of favipiravir and hydroxychloroquine in COVID-19. *Res. Rev. Insights*. 2021;5:1–7. DOI: 10.15761/RRI.1000167.
7. Cakir B. K., Firat O., Demirkan K. Administration of Potential Medications for COVID-19 Treatment Through Feeding Tube. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(3):250. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.52223.
8. Балыкова Л. А., Заславская К. Я., Павелкина В. Ф., Пятаев Н. А., Селезнева Н. М., Кириченко Н. В., Иванова А. Ю., Родоман Г. В., Колонтарев К. Б., Скрупский К. С., Симакина Е. Н. Эффективность и безопасность инфузионного введения фавипиравира у пациентов, госпитализированных с COVID-19. *Фармация и фармакология*. 2022;10(1):113–126. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
10. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Elshafeey A. H., Mansour F. R. Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid–liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*. 2021;14(4):205–216. DOI: 10.4155/bio-2021-0219.
11. Duse P. V., G Baheti K. G. Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Favipiravir in Spiked Human Plasma by using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(47A):275–281. DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i47A33014.
12. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
13. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
14. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
15. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.
16. Onmaz D. E., Abusoglu S., Onmaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS/MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
17. Bulduk İ. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. 2021;33(3):209–215. DOI: 10.1556/1326.2020.00828.

REFERENCES

1. Yu Y., Lau M. M., Lau J. T. Application of the protection motivation theory to understand determinants of compliance with the measure of banning gathering size >4 in all public areas for controlling COVID-19 in a Hong Kong Chinese adult general population. *Plos one*. 2022;17(5):e0268336. DOI: 10.1371/journal.pone.0268336.

2. Zaplatnikov A. L., Burceva E. I., Girina A. A., Svincickaja V. I., Lepiseva I. V. active specific immunoprophylaxis of influenza in the context of the covid-19 pandemic and the beginning of vaccination against coronavirus infection caused by the SARS-COV-2 virus. *Pediatrija. Consilium Medicum*. 2020;4:12–16. (In Russ.) DOI: 10.26442/26586630.2020.4.200580.
3. Chenchula S., Karunakaran P., Sharma S., Chavan M. Current evidence on efficacy of COVID-19 booster dose vaccination against the Omicron variant: A systematic review. *Journal of Medical Virology*. 2022;94(7):2969–2976. DOI: 10.1002/jmv.27697.
4. Tseng H. F., Ackerson B. K., Luo Y., Sy L. S., Talarico C. A., Tian Y., Bruxvoort K. J., Tubert J. E., Florea A., Ku J. H., Lee G. S. Effectiveness of mRNA-1273 against SARS-CoV-2 Omicron and Delta variants. *Nature Medicine*. 2022;28(5):1063–1071. DOI: 10.1038/s41591-022-01818-y.
5. Zhao L., Zhong W. Mechanism of action of favipiravir against SARS-CoV-2: Mutagenesis or chain termination? *The Innovation*. 2021;2(4):100165. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100165.
6. Pavlova V., Hristova S., Uzunova K., Vekov T. A review on the mechanism of action of favipiravir and hydroxychloroquine in COVID-19. *Res. Rev. Insights*. 2021;5:1–7. DOI: 10.15761/RRI.1000167.
7. Cakir B. K., Firat O., Demirkan K. Administration of Potential Medications for COVID-19 Treatment Through Feeding Tube. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2021;18(3):250. DOI: 10.4274/tjps.galenos.2021.52223.
8. Balykova L. A., Zaslavskaja K. Ja., Pavelkina V. F., Pjataev N. A., Selezneva N. M., Kirichenko N. V., Ivanova A. Ju., Rodoman G. V., Kolontarev K. B., Skrupskij K. S., Simakina E. N. effectiveness and safety of favipiravir infusion in patients hospitalized with COVID-19. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(1):113–126. (In Russ.) DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-1-113-126.
9. Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakareia Z., Abu Dayyih W. Development and Validation of a Method for Quantification of Favipiravir as COVID-19 Management in Spiked Human Plasma. *Molecules*. 2021;26(13):3789. DOI: 10.3390/molecules26133789.
10. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Elshafeey A. H., Mansour F. R. Determination of favipiravir in human plasma using homogeneous liquid–liquid microextraction followed by HPLC/UV. *Bioanalysis*. 2021;14(4):205–216. DOI: 10.4155/bio-2021-0219.
11. Duse P. V., G Baheti K. G. Bioanalytical Method Development and Validation for the Determination of Favipiravir in Spiked Human Plasma by using RP-HPLC. *Journal of Pharmaceutical Research International*. 2021;33(47A):275–281. DOI: 10.9734/JPRI/2021/v33i47A33014.
12. Abdallah I. A., Hammad S. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthol-assisted homogenous liquid-liquid microextraction for HPLC/UV determination of favipiravir as an antiviral for COVID-19 in human plasma. *Journal of Chromatography B*. 2022;1189:123087. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.123087.
13. Megahed S., Habib A., Hammad S., Kamal A. Chemometric Approach Based on Factorial and Box-Behnken Designs for Determination of Anti Coronavirus Drug; Favipiravir in Bulk and Spiked Human Plasma by Green HPLC Method. *Turkish Journal of Analytical Chemistry*. 2021;3(2):70–78. DOI: 10.51435/turkjac.963652.
14. Morsy M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Zainelabdeen M. A., Darwish M. M., Hassan A. Y., Gouda A. S., Rezk M. R., Abdel-Megied A. M., Marzouk H. M. A Novel LC-MS/MS Method for Determination of the Potential Antiviral Candidate Favipiravir for the Emergency Treatment of SARS-CoV-2 Virus in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study in Egyptian Human Volunteers. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2021;199:114057. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114057.
15. Rezk M. R., Badr K. A., Abdel-Naby N. S., Ayyad M. M. A Novel, Rapid and Simple UPLC–MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma: Application to a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2021;35(7):e5098. DOI: 10.1002/bmc.5098.
16. Onmaz D. E., Abusoglu S., Onmaz M., Yerlikaya F. H., Unlu A. Development and validation of a sensitive, fast and simple LC-MS/MS method for the quantitation of favipiravir in human serum. *Journal of Chromatography B*. 2021;1176:122768. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122768.
17. Bulduk İ. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica*. 2021;33(3):209–215. DOI: 10.1556/1326.2020.00828.