

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226>
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров¹, П. К. Карнакова¹✉, О. А. Арчакова¹, Д. С. Щелгачева¹,
Н. С. Багаева¹, И. Е. Шохин¹, К. Я. Заславская², П. А. Белый²

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: Карнакова Полина К. E-mail: p.karnakova@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: 30.12.2022

Статья принята в печать: 13.02.2023

Статья опубликована: 24.02.2023

Резюме

Введение. Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), которое продолжает представлять серьезную опасность для здоровья. Молнупиравир и фавипиравир – противовирусные препараты с анти-РНК-полимеразной активностью, одобренные Министерством здравоохранения Российской Федерации для лечения COVID-19. Разработка и валидация методики совместного определения метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека является необходимой процедурой для проведения аналитической части клинического исследования с целью дальнейшего изучения фармакокинетики.

Цель. Целью исследования является разработка и валидация методики совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) для дальнейшего изучения фармакокинетики молнупиравира и фавипиравира.

Материалы и методы. Определение β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ-МС/МС. В качестве пробоподготовки был использован способ осаждения белков 0,1 % раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле. Внутренний стандарт: прометазин. Подвижная фаза: аммонийно-форматный буфер 0,01 моль/л (Элюент А), 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08 % аммиака (Элюент В). Колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм. Аналитический диапазон методики: 50,00–10000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина, 250,00–20000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Источник ионизации: электроспрей. Условия детектирования: 260,00 м/з → 82,10 м/з, 260,00 м/з → 111,00 м/з, 260,00 м/з → 127,95 м/з (β-D-N4-гидроксицитидин); 156,15 м/з → 65,95 м/з, 156,15 м/з → 85,00 м/з, 156,15 м/з → 113,10 м/з (фавипиравир); 285,05 м/з → 198,05 м/з (прометазин).

Результаты и обсуждение. Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, пригодность стандартного образца, эффект матрицы, калибровочная кривая, точность, прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения перенос пробы, стабильность.

Заключение. Разработана и валидирована методика совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина и 250,00–20000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов молнупиравира и фавипиравира.

Ключевые слова: β-D-N4-гидроксицитидин, ННС, молнупиравир, фавипиравир, COVID-19, плазма, ВЭЖХ-МС/МС, 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. Совместное определение основного метаболита молнупиравира (β-D-N4-гидроксицитидина) и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(1):215–226. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226>

Simultaneous Determination of Major Molnupiravir Metabolite (β-D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov¹, Polina K. Karnakova¹✉, Olga A. Archakova¹, Dana S. Shchelgacheva¹,
Natalia S. Bagaeva¹, Igor E. Shohin¹, Kira Ya. Zaslavskaya², Petr A. Bely²

© Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А., 2023

© Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., 2023

¹ LLC "CPHA", 20/3, Nauchny proezd, Moscow, 117246, Russia

² LLC "PROMOMED RUS", 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ Corresponding author: Polina K. Karnakova. E-mail: p.karnakova@cpha.ru

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: 30.12.2022

Revised: 13.02.2023

Published: 24.02.2023

Abstract

Introduction. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) is an infectious disease caused by the SARS-CoV-2 virus (severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2). COVID-19 is now expected to stay with us for many years as a recurring disease. Molnupiravir and favipiravir are oral antiviral drugs with anti-RNA polymerase activity. The Russian Health Ministry has approved molnupiravir and favipiravir for the treatment of COVID-19. The study describes development and validation of high-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human blood plasma. The method could be applied in pharmacokinetic study of molnupiravir and favipiravir.

Aim. The aim of this study is to develop and validate a HPLC-MS/MS bioanalytical method for the determination of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma.

Materials and methods. The determination of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma by HPLC-MS/MS. The samples were processed by 0.1 % formic acid in acetonitrile. Internal standard: promethazine. Mobile phase: 0.01 mol/L Ammonium formate buffer solution (Eluent A), 0.1 % formic acid and 0.08 % aqueous ammonia in water/acetonitrile 10:90 (Eluent B). Column: Shim-pack GWS C18, 150 × 4.6 mm, 5 μ m. Analytical range: 50.00–10000.00 ng/mL for β -D-N4-Hydroxycytidine, 250.00–20000.00 ng/mL for favipiravir in human plasma. Ionization source: electrospray ionization. Detection conditions: 260.00 m/z → 82.10 m/z, 260.00 m/z → 111.00 m/z, 260.00 m/z → 127.95 m/z (β -D-N4-Hydroxycytidine); 156.15 m/z → 65.95 m/z, 156.15 m/z → 85.00 m/z, 156.15 m/z → 113.10 m/z (favipiravir); 285.05 m/z → 198.05 m/z (promethazine).

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

Conclusion. The HPLC-MS/MS method for quantitative determination of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir in human plasma was developed and validated. The analytical range was 50.00–10000.00 ng/mL for β -D-N4-Hydroxycytidine, 250.00–20000.00 ng/mL for favipiravir in human plasma. This method was applied to investigate the pharmacokinetics of molnupiravir and favipiravir.

Keywords: β -D-N4-Hydroxycytidine, NHC, molnupiravir, favipiravir, COVID-19, plasma, HPLC-MS/MS, 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 developed and validated the analytical method. Natalia S. Bagaeva carried out the statistical analysis. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely conceived the study and were in charge of direction and planning. All authors discussed the results.

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. Simultaneous Determination of major molnupiravir metabolite (β -D-N4-hydroxycytidine) and Favipiravir in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(1):215–226. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226>

ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция [Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)] – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), которое продолжает представлять серьезную опасность для здоровья. Известно, что появление новых разновидностей коронавируса SARS-CoV-2 приводит к росту заболеваемости COVID-19 [2]. Одним из самых последних субвариантов омикрон-штамм коронавируса является штамм «Кракен» [2, 3]. Несмотря на то, что патогенность Кракена по сравнению с другими вариантами омикрона изменилась незначительно [2], важно продолжать заниматься разработкой новых лекарственных препаратов для лечения COVID-19, чтобы быть готовыми к появлению новых вариантов вируса SARS-CoV-2 с различной патогенностью.

В настоящее время согласно версии № 17 временных методических рекомендаций Министерства здравоохранения Российской Федерации по профилактике, диагностике и лечению новой коронавирусной инфекции для этиотропной терапии COVID-19 рекомендуется назначать такие противовирусные препараты, как молнупиравир и фавипиравир¹.

Молнупиравир (((2R,3S,4R,5R)-3,4-Дигидроксипентан-2-ил)-4-гидроксиамино)-2-оксопиримидин-1(2H)-ил]оксолан-2-ил]метил(2-метилпропаноат) – противовирусный препарат с анти-РНК-полимеразной активностью. Молнупиравир является пролекарством, которое в

¹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 05.02.2023.

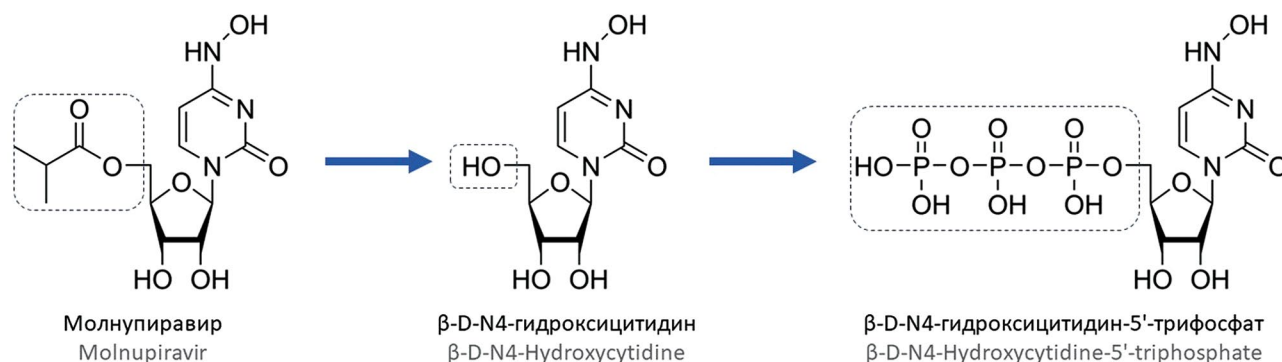


Рисунок 1. Метаболизм молнупиравира

Figure 1. Molnupiravir metabolism

плазме крови под действием эстеразы метаболизируется до аналога рибонуклеозида β-D-N4-гидроксицитидина (NHC [β-D-N4-Hydroxycytidine, NHC]). Затем β-D-N4-гидроксицитидин фосфорилируется под действием киназы с образованием активного рибонуклеозидтрифосфата, который в свою очередь встраивается в РНК вируса, вызывая накопление мутаций и подавление вирусной репликации [4–6]. Схема метаболических превращений молнупиравира представлена на рисунке 1. Препарат обладает пероральной биодоступностью, поэтому может назначаться амбулаторным пациентам на ранних стадиях заболевания COVID-19 [5, 6]. В России молнупиравир рекомендован к применению для лечения COVID-19 с легким или среднетяжелым течением у взрослых, в том числе в случаях повышенного риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения и не требующих дополнительной оксигенотерапии. Для медикаментозного лечения COVID-19 следует назначать препарат молнупиравир как можно раньше после постановки диагноза¹.

Фавипиравир (5-фтор-2-оксо-1Н-пиразин-3-карбоксамид, ФАВ [Favipiravir, FAV]) является синтетическим препаратом с прямым противовирусным действием в отношении вирусной РНК-полимеразы. Механизм действия фавипиравира схож с механизмом действия молнупиравира. Аналогично молнупиравир, фавипиравир является пролекарством, которое после фосфорилирования переходит в активную форму и ингибирует вирусную РНК-полимеразу [7, 8]. В России зарегистрированы препараты фавипиравира для перорального и парентерального введения².

¹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 17 (14.12.2022)» (утв. Минздравом России). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_347896/ Ссылка активна на 05.02.2023.

² ГРЛС – Министерство здравоохранения Российской Федерации. Доступно по: <https://grls.rosminzdrav.ru/> Ссылка активна на 05.02.2023.

Известно, что совместное применение молнупиравира и фавипиравира является возможным, поскольку оба препарата обладают высокой биодоступностью при пероральном введении [7]. Также отмечается, что при совместном приеме с фавипиравиром возможно применять молнупиравир в более низкой дозе [7, 9].

В настоящее время опубликован целый ряд новых исследований по определению метаболита молнупиравира β-D-N4-гидроксицитидина, а также фавипиравира в биологических жидкостях человека с целью изучения фармакокинетических параметров. Для определения β-D-N4-гидроксицитидина в биологических жидкостях применяются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandem масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)], а также метод сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandem масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)]. Для определения фавипиравира 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)], а также ВЭЖХ-МС/МС и СВЭЖХ-МС/МС.

В методиках определения β-D-N4-гидроксицитидина в качестве пробоподготовки используется способ осаждения белков ацетонитрилом, а также ультрафильтрация; в методиках определения фавипиравира – жидкость-жидкостная экстракция (ЖЖЭ), а также осаждение белков плазмы крови различными органическими растворителями (таблица 1).

До настоящего времени в научной литературе не было опубликовано методик совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в био-

Таблица 1. Биоаналитические методики количественного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира

Table 1. Bioanalytical methods of β-D-N4-Hydroxycytidine and 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
<i>NHC</i>				
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; +) HPLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	20,00–10000,00 нг/мл 20.0–10000.0 ng/mL	[10]
ВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) HPLC-MS/MS (electrospray; –)	Плазма крови человека, слюна человека Human plasma, saliva	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation by acetonitrile	2,50–5000,00 нг/мл 2.50–5000.00 ng/mL	[11]
СВЭЖХ-МС/МС (электроспрей; –) UPLC-MS/MS (electrospray; +)	Плазма крови человека Human plasma	Ультрафильтрация Ultrafiltration	1,00–5000,00 нг/мл 1.00–5000.00 ng/mL	[12]
<i>ΦAB FAV</i>				
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	3,10–60,00 мкг/мл 3.10–60.00 µg/mL	[13]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	ЖЖЭ Liquid-liquid extraction	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 µg/mL	[14]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма человека Human plasma	Осаждение белков метанолом Protein precipitation by methanol	0,25–200,00 мкг/мл 0.25–200.00 µg/mL	[15]
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	[16]
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	[17]
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	[18]

логических матрицах человека, поэтому было принято решение разработать и валидировать методику совместного определения данной комбинации веществ самостоятельно. Ранее нами уже была разработана методика определения фавипиравира в плазме крови методом ВЭЖХ-УФ с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении [15]. В данном исследовании приведена разработка и валидация методики совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС при пероральном применении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Для проведения хроматографического разделения и детектирования был использован высокоэффективный жидкостной хроматограф Nexera XR с градиентным насосом, термостатом колонок и образцов, дегазатором, автосамплером, устройством автоматической подачи образцов в автосамплер, крапом переключения линии потока высокого давления и с tandemным масс-спектрометрическим детектором LCMS-8040 (тройной квадруполь). Обработка первич-

ных данных была проведена при помощи программного обеспечения LabSolutions (Ver. 5.91, Shimadzu Corporation, Япония).

Реактивы и растворы

При проведении исследования были использованы следующие реактивы: ацетонитрил (класс «HPLC Super Gradient», Macron, Польша); метанол (класс х.ч., ООО ТД «ХИММЕД», Россия); муравьиная кислота (класс «98 % pure», PanReas, Германия & AppliChem, Испания); водный раствор аммиака 30 % («for analysis, ACS», PanReas, Германия & AppliChem, Испания); аммоний формиат «eluent additive for LC-MS, LiChropur™, >99.0 %», Sigma-Aldrich, США); вода деминерализованная (I класс чистоты).

Для приготовления исходных стандартных растворов (ИСР) и рабочих стандартных растворов (РСР) были использованы стандартные образцы (СО) β-D-N4-гидроксицитидина (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 93,00 %), фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, количественное содержание 100,40 %), а также прометазина гидрохлорида (USP reference standard, Франция, количественное содержание 99,90 %). ИСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира, а также ИСР внутреннего стандарта [BC (internal standard, IS)] прометазина [ПРОМ (Promethazine, PROM)]. готовили путем растворения точных навесок субстанций в метаноле. Концентрация ИСР β-D-N4-гидроксицитидина составила 200 000,00 нг/мл, фавипиравира – 400 000,00 нг/мл, прометазина – 100 000,00 нг/мл.

Смешанные РСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира были приготовлены путем разведения ИСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира метанолом до получения в плазме концентраций калибровочных уровней № 1–8 и уровней контроля качества (КК): нижнему пределу количественного определения (НПКО) [Lower limit of quantification (LLOQ)], низкому [L (low)], среднему [M1 и M2 (middle 1, middle 2)] и высокому уровням [H (high)] (таблица 2). РСР BC прометазина был приготовлен путем разведения ИСР прометазина метанолом до получения в плазме концентраций 256,10 нг/мл.

Образцы интактной плазмы крови, а также ИСР и РСР хранились в морозильной камере при температуре $-42,5 \pm 7,5$ °C.

Пробоподготовка

В центрифужную микропробирку типа «Эппендорф» переносили аликвоту образца, прибавляли РСР BC прометазина, затем проводили осаждение белков плазмы крови 0,1 % раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле. После этого образец перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, проводили центрифугирование в течение 15 мин с ускорением 15 000 g, переносили суперна-

тант в хроматографические виалы, помещали виалы в автосамплер хроматографа. На рисунке 2 представлена схема пробоподготовки.

Таблица 2. Концентрации определяемых веществ в калибровочных образцах и образцах КК

Table 2. β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir concentrations at calibration levels and quality control samples

Уровень Level	Концентрация аналита, нг/мл Analyte concentration, ng/ml		Концентрация ВС, нг/мл IS concentration, ng/ml
	NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM
1	50,00	250,00	256,10
2	250,00	500,00	256,10
3	500,00	1000,00	256,10
4	1000,00	3000,00	256,10
5	3000,00	6000,00	256,10
6	6000,00	10000,00	256,10
7	8000,00	15000,00	256,10
8	10000,00	20000,00	256,10
LLOQ	50,00	250,00	256,10
L	150,00	750,00	256,10
M1	2000,00	4000,00	256,10
M2	5000,00	12000,00	256,10
H	7500,00	16000,00	256,10

Условия хроматографического разделения и детектирования

- Колонка: Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.
- Предколонка: Phenomenex SecurityGuard™ Cartridges C18, 4 × 3,0 мм, 5 мкм.
- Температура термостата: 40 °C.
- Подвижная фаза: Элюент А: аммонийно-формиатный буфер 0,01 моль/л (по объему); Элюент В: 0,1 % муравьиной кислоты, 10 % воды в ацетонитриле с прибавлением 0,08 % аммиака (по объему).
- Градиент по составу подвижной фазы и скорость потока подвижной фазы представлены в таблице 3.

Таблица 3. Градиентное элюирование

Table 3. Gradient elution

Время, мин Time, min	Элюент А, % Eluent A, %	Элюент В, % Eluent B, %	Скорость потока, мл/мин Flow rate, mL/min
0,00	94,00	6,00	1,70
0,90	94,00	6,00	1,70
0,95	0,00	100,00	1,70
1,00	0,00	100,00	1,00
1,40	0,00	100,00	1,00
1,50	94,00	6,00	1,00
3,10	94,00	6,00	1,00
3,20	94,00	6,00	1,70
4,50	94,00	6,00	1,70

- Объем вводимой пробы: 20 мкл.
- Время регистрации хроматограммы по масс-спектрометрическому детектору: 0,00–4,50 мин.

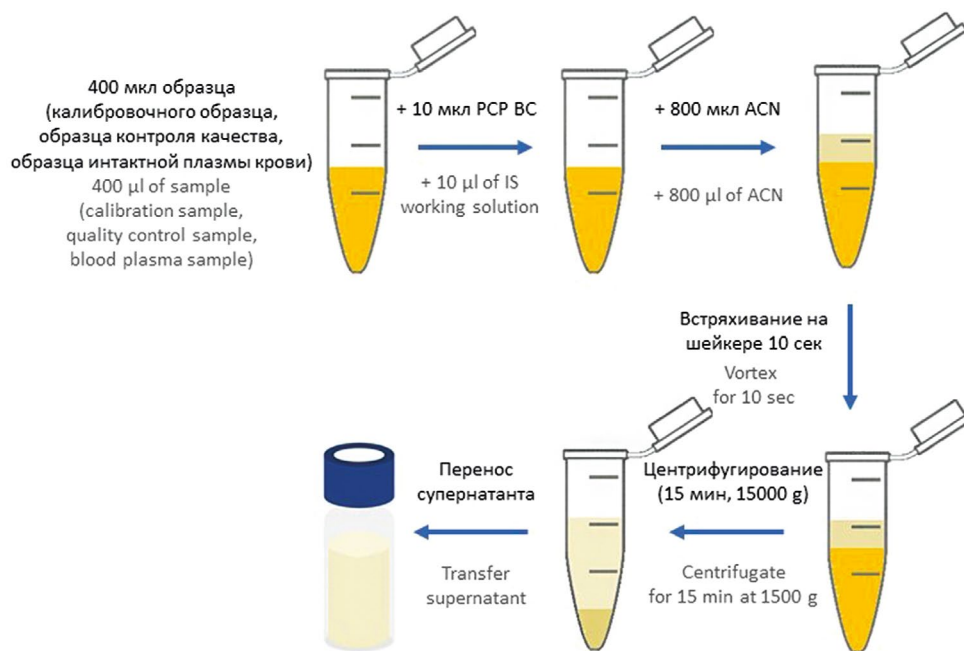


Рисунок 2. Схема пробоподготовки

Figure 2. Sample preparation

- Источник ионизации: электроспрей.
- Параметры источника ионизации: распыляющий газ 3 л/мин, осушающий газ 20 л/мин, блок нагрева 400 °C, линия десольватации 200 °C.
- Напряжение на капилляре, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Параметры источника ионизации и условия детектирования

Table 4. Ion-source parameters and detection conditions

	Режим ионизации, напряжение на капилляре, кВ Ion mode, capillary voltage, kV	Условия детектирования, m/z Detection conditions, m/z
NHC	+5,0	260,00 → 82,10 260,00 → 111,00 260,00 → 127,95
ФAB FAV	-5,0	156,15 → 65,95 156,15 → 85,00 156,15 → 113,10
ПРОМ PROM	+4,5	285,05 → 198,05

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики

Молнупиравир в плазме крови человека метаболизируется до β-D-N4-гидроксицитидина, который не связывается с белками плазмы крови [4–6]. В связи с этим проводится количественное определение в плазме крови человека основного метаболита β-D-N4-гидроксицитидина.

В качестве ВС для β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира был выбран прометазин ((RS)-N,N,α-триметил-10Н-фенотиазин-10-этанамин). Прометазин имеет схожую с аналитическими веществами структуру и физико-химические свойства (таблица 5).

Таблица 5. Физико-химические свойства анализируемых веществ и внутреннего стандарта

Table 5. Chemical and physical characteristics of the analytes and IS

	pKa	log P	Молекулярная масса Molecular weight
NHC ¹ NHC ¹	12,55	-2,70	259,218
ФАВ ² FAV ²	9,39	0,49	157,104
ПРОМ ³ PROM ³	9,05	4,29	284,419

Примечание. ¹ N4-Hydroxycytidine. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB15660>. Ссылка активна на 05.02.2023.

² Favipiravir. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB12466>. Ссылка активна на 05.02.2023.

³ Promethazine. Drugbank. Доступно по: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01069>. Ссылка активна на 05.02.2023.

Note. ¹ N4-Hydroxycytidine. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB15660>. Accessed: 05.02.2023.

² Favipiravir. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB12466>. Accessed: 05.02.2023.

³ Promethazine. Drugbank. Available at: <https://go.drugbank.com/drugs/DB01069>. Accessed: 05.02.2023.

Для проведения анализа были использованы условия масс-спектрометрического детектирования, позволяющие получить пики β-D-N4-гидроксицитидина.

на, фавипиравира и прометазина с наибольшей интенсивностью. Для этого во время разработки методики были проанализированы фрагменты, получаемые при разных энергиях соударения.

Для хроматографического разделения данной комбинации веществ, исходя из их физико-химических свойств, была выбрана колонка Shim-pack GWS C18, 150 × 4,6 мм, 5 мкм.

В качестве пробоподготовки рассматривались варианты осаждения белков плазмы крови ацетонитрилом, подкисленным раствором ацетонитрила, метанолом и трифторуксусной кислотой. В итоге, в качестве осадителя был выбран 0,1 % раствор муравьиной кислоты в ацетонитриле, т. к. только при его использовании происходило наиболее полное осаждение белков плазмы крови и обеспечивалась оптимальная форма хроматографических пиков.

Валидация методики

Валидация разработанной биоаналитической методики была проведена в соответствии с правилами проведения исследований биоэквивалентности в рамках Евразийского экономического союза¹ на основе правил руководств EMA² и FDA³. Методика прошла полную валидацию по следующим параметрам: селективность, пригодность СО, калибровочная кривая, точность и прецизионность, степень извлечения, нижний предел количественного определения (НПКО), перенос пробы, стабильность (стабильность ИСР и РСР; краткосрочная стабильность аналита в матрице («насто́льная» и «постпрепаративная»), долгосрочная стабильность аналита в матрице; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке). Основные валидационные характеристики с критериями приемлемости представлены в таблице 6.

Селективность

Использовались по шесть различных образцов интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы крови и гиперлипидемической интактной плазмы крови, в которых было доказано отсутствие содержания анализируемых веществ, а также образцы с добавлением РСР до концентраций на уровне НПКО (см. таблица 2). Хроматограмма образца интактной плазмы крови человека представлена на рисунке 3.

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 05.02.2023.

² European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation/> Accessed: 05.02.2023.

³ Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry/> Accessed: 05.02.2023.

Таблица 6. Основные валидационные характеристики

Table 6. Validation characteristics

Валидационная характеристика Validation characteristics	Критерий приемлемости Acceptance criteria
Селективность Selectivity	Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Blank samples: the analyte ≤20 % LLOQ, the IS response ≤5 %
Пригодность стандартного образца Suitability of reference standard	Нулевой образец: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, калибровочный образец 8 уровня без ВС: сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Zero calibrators: the analyte ≤20 % LLOQ, calibration level 8 no IS ≤5 % IS
Калибровочная кривая Calibration curve	$R \geq 0,99$; $-20 \% \leq E, \% \leq 20 \%$ – для концентрации на уровне НПКО, $-15 \% \leq E, \% \leq 15 \%$ – для концентраций остальных точек $R \geq 0,99$; $-15 \% \leq E \leq 15 \%$, except $-20 \% \leq E \leq 20 \%$ at LLOQ
Точность (внутри циклов, между циклами) Accuracy (inter-day, intra-day)	$-20 \% \leq E, \% \leq 20 \%$ – для концентрации на уровне НПКО, $-15 \% \leq E, \% \leq 15 \%$ – для концентраций остальных точек $-15 \% \leq E \leq 15 \%$, except $-20 \% \leq E \leq 20 \%$ at LLOQ
Прецизионность (внутри циклов, между циклами) Precision (inter-day, intra-day)	$RSD \leq 20 \%$ – для концентрации на уровне НПКО, $RSD \leq 15 \%$ – для концентраций остальных точек $RSD \leq 15 \%$, except $RSD \leq 20 \%$ at LLOQ
НПКО LLOQ	$RSD \leq 20 \%$, $-20 \% \leq E, \% \leq 20 \%$
Степень извлечения Spike recovery	$RSD \leq 15 \%$
Эффект матрицы Matrix effect	Фактор матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы ВС: $RSD \leq 15 \%$ IS-normalized matrix factors of the analytes: $RSD \leq 15 \%$
Стабильность Stability	$-15 \% \leq E, \% \leq 15 \%$
Перенос пробы Carry-over effect	Образец интактной плазмы крови: сигнал аналита ≤20 % от сигнала НПКО, сигнал ВС ≤5 % от сигнала ВС Blank samples: the analyte ≤20 % LLOQ, the IS response ≤5 %

Примечание. RSD, % – относительное стандартное отклонение, E, % – относительная погрешность.

Note. RSD, % – relative standard deviation, E, % – relative error.

Пригодность стандартного образца

Проводили анализ нулевого образца, приготовленного с добавлением раствора ВС (ПРОМ 256,10 нг/мл), образца, приготовленного из интактной плазмы крови с добавлением смешанного РСР (ННС 10 000,00 нг/мл, ФАВ 20 000,00 нг/мл) и без добавления ВС, образца контроля качества на уровне НПКО (ННС 50,00 нг/мл, ФАВ 250,00 нг/мл). Хроматограмма образца для оценки пригодности СО представлена на рисунке 4.

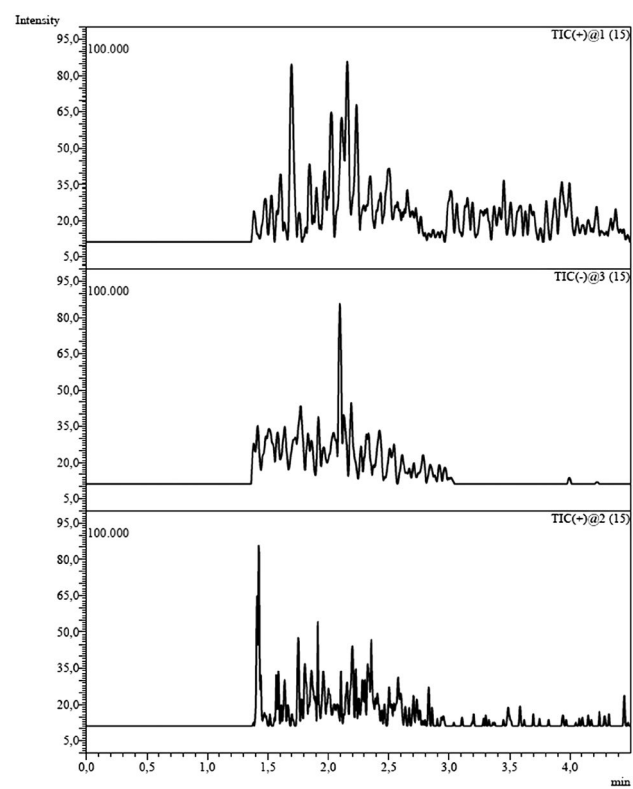


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови
Figure 3. Chromatogram of blank human plasma sample

Калибровочная кривая

Для оценки данного параметра был проведен анализ восьми образцов интактной плазмы крови с прибавлением РСР ВС прометзина до концентрации 256,10 нг/мл и смешанных РСР β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира до концентраций β-D-N4-гидроксицитидина в диапазоне 50,00–10 000,00 нг/мл и фавипиравира в диапазоне 250,00–20 000,00 нг/мл. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах отношение площади пика аналита к площади пика ВС от отношения концентрации аналита к концентрации ВС в плазме крови.

Калибровочные графики имели линейный вид. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции (R) для калибровочных графиков в вали-

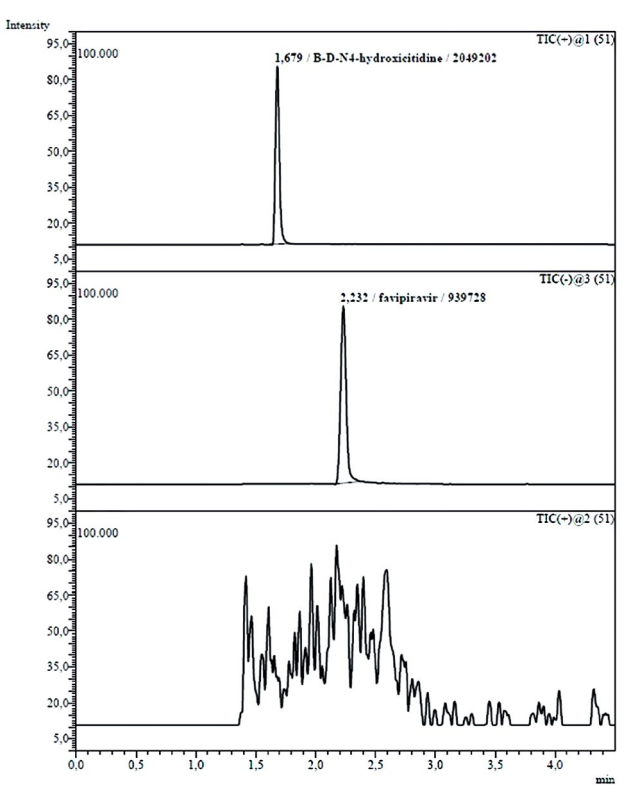


Рисунок 4. Хроматограмма образца без внутреннего стандарта (NHC 10 000,00 нг/мл, ФАВ 20 000,00 нг/мл)
Figure 4. Chromatogram of sample without IS (NHC 10 000.00 ng/mL, FAV 20 000.00 ng/mL)

дационных циклах № 1–4 приведены в таблице 7. Полученные значения коэффициентов корреляции составляют более 0,99.

Точность и прецизионность

Были проанализированы калибровочные образцы плазмы крови, соответствующие уровням контроля качества LLOQ, L, M1, M2 и H (см. таблица 2). Анализ проводили в рамках 4 последовательностей по 5 вводов образца для каждого уровня концентрации β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира. Исследование проводили в течение 1–4 последовательностей (внутри циклов и между циклами). Для полученных значений концентраций были рассчитаны величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) и

Таблица 7. Уравнения калибровочных кривых и коэффициенты корреляции
Table 7. Calibration equation and correlation coefficients

№	NHC		ФАВ FAV	
	Уравнение Calibration equation	R	Уравнение Calibration equation	R
1	0,0357194 · x + 0,00290660	0,9987935	0,00746999 · x + 0,000430450	0,9992086
2	0,0438155 · x + 0,00249078	0,9996536	0,00819751 · x + 0,000837929	0,9985260
3	0,0390813 · x + 0,00274801	0,9980786	0,00721237 · x – 3,78162e – 007	0,9987659
4	0,0310063 · x + 0,00444778	0,9977221	0,00300419 · x + 0,000701577	0,9965709

относительной погрешности (E, %); на уровне между циклами использовались данные, полученные в течение 1–3 последовательностей (между циклами, $n = 15$), а также в течение 1–4 последовательностей (между циклами, $n = 20$). Данные точности и прецизионности методики определения β -D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира между 1–4 последовательностями ($n = 20$) представлены в таблице 8.

Таблица 8. Точность и прецизионность методики определения β -D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира ($n = 20$)

Table 8. Accuracy and precision of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir determination ($n = 20$)

Введено (мкг/мл) Injected (μ g/mL)	NHC		ФАВ FAV	
	RSD, %	E, %	RSD, %	E, %
LLOQ	10,95	-0,58	9,82	-0,01
L	5,17	0,76	8,44	-5,23
M1	2,66	0,32	5,13	-6,34
M2	4,83	-4,52	5,26	-6,46
H	4,19	-6,39	4,70	-5,32

Нижний предел количественного определения

За НПКО методики была принята минимальная концентрация β -D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови в аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение со значениями RSD и E не более 20 %: 50,00 нг/мл для β -D-N4-гидроксицитидина и 250,00 нг/мл для фавипиравира. Хроматограмма плазмы крови с содержанием аналитических веществ на уровне НПКО представлена на рисунке 5.

Степень извлечения

Были проанализированы по три образца, приготовленные из интактной плазмы крови, гемолизной интактной плазмы и гиперлипидемической интактной плазмы без влияния степени извлечения на уровнях L,

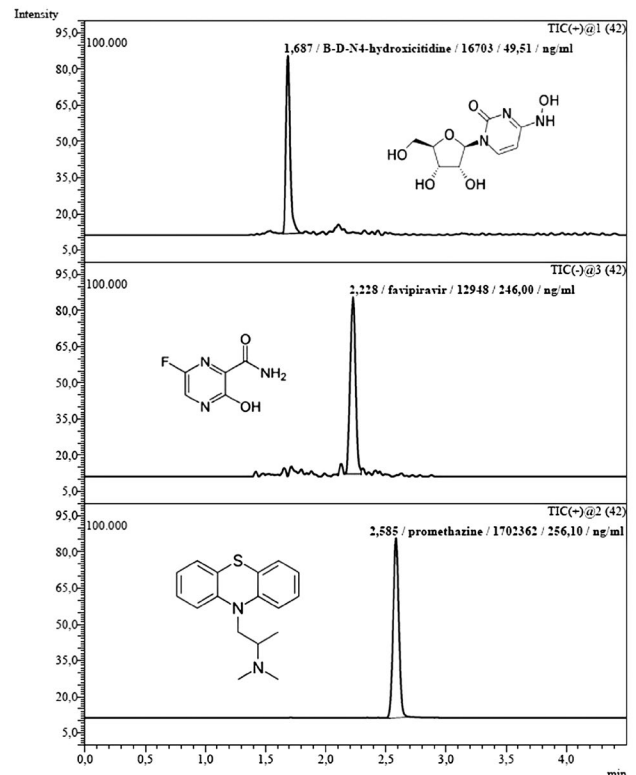


Рисунок 5. Хроматограмма образца плазмы крови (NHC 50,00 нг/мл, ФАВ 250,00 нг/мл)

Figure 5. Chromatogram of plasma sample (NHC 50.00 ng/mL, FAV 250.00 ng/mL)

M1, M2 и H (см. таблица 2), а также образцы КК, приготовленные на различных видах биологической интактной матрицы для оценки степени извлечения. Среднее значение степени извлечения β -D-N4-гидроксицитидина из различных видов интактных биологических матриц составляет 91,37 % (RSD = 10,20 %), фавипиравира – 91,96 % (RSD = 12,75 %). Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9. Оценка степени извлечения β -D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из различных видов биологической матрицы

Table 9. Calculation of β -D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir recovery at levels L, M1, M2, H

Биологическая матрица Biological matrix	СИ NHC, % Recovery NHC, %				СИ ФАВ, % Recovery FAV, %			
	L	M1	M2	H	L	M1	M2	H
Интактная плазма крови Blank plasma	79,51	100,45	95,72	88,93	71,89	92,79	97,00	83,87
	83,72	98,75	105,48	93,07	73,16	98,42	107,71	95,30
	80,08	108,52	111,36	86,89	67,18	108,35	106,65	83,95
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	87,34	98,58	90,01	94,65	76,19	100,41	104,01	91,37
	77,66	101,50	91,09	92,27	75,67	105,71	98,33	92,51
	86,66	91,25	96,63	97,40	85,67	91,36	104,00	97,25
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	75,06	95,62	95,43	80,90	70,24	101,50	104,37	79,89
	74,45	97,28	93,27	86,42	85,22	101,08	95,25	88,36
	78,59	96,27	99,72	78,75	87,81	98,78	105,51	83,78
Среднее Average	91,37				91,96			
RSD	10,20				12,75			

Эффект матрицы

Для оценки влияния биологической матрицы на количественное определение β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира были проанализированы образцы с добавлением смешанных РСР без влияния биологической матрицы, а также образцы, приготовленные на интактной плазме без учета влияния степени извлечения анализируемых веществ и ВС из биологической матрицы. Эффект матрицы был оценен на уровнях L и H аналитических диапазонов концентраций β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира (таблица 2). Для ВС прометазина эффект матрицы был рассчитан на уровне 256,10 нг/мл. Данные представлены в таблице 10.

Стабильность

Были проанализированы по пять образцов для оценки настольной и постпрепаративной краткосрочной заморозке-разморозке, стабильности исходных и рабочих стандартных растворов (при хранении в течение 24 дней при температуре -50 до -35 °C), долгосрочной стабильности аналита на уровнях L и H (таблица 2). Долгосрочная стабильность была оценена дважды: проводилась промежуточная оценка при хранении в течение 24 дней при температуре от -25 до -15 °C и при температуре от -85 до -65 °C а также дополнительная оценка при хранении в течение 59 дней при температуре от -25 до -15 °C и при температуре от -85 до -65 °C, поскольку минимальный срок для оценки данного вида стабильности должен соответствовать периоду хранения

образцов от начала отбора в клиническом центре до момента завершения анализа последней пробы аналитического этапа исследования. Результаты оценки стабильности представлены в таблице 11.

Таблица 10. Расчет фактора матрицы анализируемых веществ, нормализованного по фактору матрицы внутреннего стандарта

Table 10. Calculation of IS-normalized matrix factors of β-D-N4-Hydroxycytidine and favipiravir

Биологическая матрица Biological matrix	ННС ННС		ФАВ FAV	
	Нормализованный Mf Normalized Mf			
	L	H	L	H
Интактная плазма крови Blank plasma	0,77	1,10	1,00	1,26
	0,79	1,05	0,96	1,16
	0,80	1,05	1,09	1,16
	0,76	1,04	0,97	1,12
	0,80	1,06	0,97	1,22
Гемолизная плазма крови Hemolyzed blank plasma	0,84	1,04	1,03	1,21
	0,70	0,95	1,02	1,15
	0,83	0,93	0,99	1,06
	0,72	0,85	0,95	0,99
	0,72	0,95	0,83	1,07
Гиперлипидемическая плазма крови Lipemic blank plasma	0,70	1,09	1,01	1,29
	0,78	1,12	0,99	1,33
	0,73	1,07	0,93	1,13
	0,79	0,99	0,90	1,12
	0,79	1,07	0,91	1,14
Среднее Average	0,78	1,05	0,98	1,19
RSD, %	6,70	10,31	6,45	9,59

Таблица 11. Оценка стабильности

Table 11. Stability assessment

Вид стабильности Type of stability	Срок и условия хранения образцов Time and storage conditions	Среднее значение E, % Average value of E, %			
		ННС		ФАВ FAV	
		L	H	L	H
«Настольная» стабильность Bench-top stability	Анализируются свежеприготовленными; хранение при температуре 20 ± 5 °C Analyzed freshly prepared; stored at 20 ± 5 °C	-10,97	-7,53	-2,54	1,63
«Постпрепаративная» стабильность Postpreparative stability	78 часа при температуре 4 °C 78 hours at 4 °C	-3,55	-4,99	-8,58	-5,68
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	4,66	-9,66	-1,86	-14,70
Долгосрочная стабильность аналита в матрице Long-term stability	24 дней при температуре -20 ± 5 °C 24 days at -20 ± 5 °C	7,02	-1,63	-8,82	-11,89
	24 дней при температуре -75 ± 10 °C 24 days at -75 ± 10 °C	9,81	0,44	-12,22	-11,94
	59 дней при температуре -20 ± 5 °C 59 days at -20 ± 5 °C	-12,68	-8,29	-11,87	-13,03
	59 дней при температуре -75 ± 10 °C 59 days at -75 ± 10 °C	-10,61	-5,71	-10,42	-11,41
Стабильность ИСР Stock solution stability	24 дней при температуре -42,5 ± 7,5 °C 24 days at -42.5 ± 7.5 °C	-2,23	-3,43	-9,62	-10,42
Стабильность РСР Work solution stability	24 дней при температуре -42,5 ± 7,5 °C 24 days at -42.5 ± 7.5 °C	8,15	-1,37	-7,11	-10,01

Таблица 12. Оценка переноса пробы
Table 12. Assessment of carry-over effect

№	Образец Sample	Значение площади Area			Отношение площадей, % Area ratio, %		
		NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM	NHC	ФАВ FAV	ПРОМ PROM
1	НПКО LLOQ	17042	12405	1758043	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	1886	0	0	11,07	0,00	0,00
2	НПКО LLOQ	16204	11618	1348471	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	0	14723	0,00	0,00	1,09
3	НПКО LLOQ	15746	12016	1581170	–	–	–
	Интактная плазма крови Blank plasma	0	0	16587	0,00	0,00	1,05

Перенос пробы

Для оценки параметра «перенос пробы» в рамках валидационных циклов № 1–3 был проведен последовательный анализ калибровочных образцов на уровне 8 (см. таблица 2) и образцов интактной плазмы крови. Результаты оценки переноса пробы представлены в таблице 12.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была проведена разработка и валидация методики совместного количественного определения β-D-N4-гидроксицитидин и фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. Подтвержденный аналитический диапазон методики составил 50,00–10 000,00 нг/мл для β-D-N4-гидроксицитидина и 250,00–20 000,00 нг/мл для фавипиравира в плазме крови. Данный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для проведения фармакокинетических исследований комбинированных препаратов молнупиравира и фавипиравира.

ЛИТЕРАТУРА

- Li C. X., Noreen S., Zhang L. X., Saeed M., Wu P. F., Ijaz M., Dai D. F., Maqbool I., Madni A., Akram F., Naveed M. A critical analysis of SARS-CoV-2 (COVID-19) complexities, emerging variants, and therapeutic interventions and vaccination strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;146:112550. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112550.
- Popovic M. XBB.1.5 Kraken Cracked: Gibbs Energies of Binding and Biosynthesis of the XBB.1.5 Variant of SARS-Cov-2. *Preprints*. 2023;2023010404. DOI: 10.20944/preprints202301.0404.v1.
- Parums D. V. The XBB. 1.5 ('Kraken') Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its Rapid Global Spread. *Medical Science Monitor: International Medical. Journal of Experimental and Clinical Research*. 2023;29:e939580. DOI: 10.12659/MSM.939580.
- Lee C. C., Hsieh C. C., Ko W. C. Molnupiravir — A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics*. 2021;10:1294. DOI: 10.3390/antibiotics10111294.
- Pourkarim F., Pourtaghi-Anvarian S., Rezaee H. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacology research & perspectives*. 2022;10(1):e00909. DOI: 10.1002/prp2.909.

- Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Schinazi R. F., Götte M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(1):100770. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100770.
- Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two green micellar HPLC and mathematically assisted UV spectroscopic methods for the simultaneous determination of molnupiravir and favipiravir as a novel combined COVID-19 antiviral regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
- Балакин К. В., Стороженко Р. В., Якубова Е. В. Фавипиравир как средство терапии COVID-19. *Научный бюллетень ХимРар*. 2023;1.
- Eloy P., Le Grand R., Malvy D., Guedj J. Combined treatment of molnupiravir and favipiravir against SARS-CoV-2 infection: One+ zero equals two? *EBioMedicine*. 2021;74:103663. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103663.
- Gouda A. S., Marzouk H. M., Rezk M. R., Salem A. M., Morsi M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Hassan A. Y., Abdel-Megied A. M. A validated LC-MS/MS method for determination of antiviral prodrug molnupiravir in human plasma and its application for a pharmacokinetic modeling study in healthy Egyptian volunteers. *Journal of Chromatography B*. 2022;1206:123363. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123363.
- Amara A., Penchala S. D., Else L., Hale C., FitzGerald R., Walker L., Lyons R., Fletcher T., Khoo S. The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite β-d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2021;206:114356. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114356.
- Parsons T. L., Kryszak L. A., Marzinke M. A. Development and validation of assays for the quantification of β-D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β-D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *Journal of Chromatography B*. 2021;1182:122921. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122921.
- Hailat M., Al-Ani I., Hamad M., Zakaria 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.
- 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.
- Комаров Т. Н., Карнакова П. К., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Шохин И. Е., Заславская К. Я., Белый П. А. Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(3):220–229. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229.

16. 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.
17. 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.
18. 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.
13. 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.
14. 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.
15. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., Bely P. A. Development and Validation of HPLC-UV Method for the Determination of Favipiravir in Human Plasma. *Drug development & registration*. 2022;11(3):220–229. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-3-220-229.
16. 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.
17. 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.
18. 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.

REFERENCES

1. Li C. X., Noreen S., Zhang L. X., Saeed M., Wu P. F., Ijaz M., Dai D. F., Maqbool I., Madni A., Akram F., Naveed M. A critical analysis of SARS-CoV-2 (COVID-19) complexities, emerging variants, and therapeutic interventions and vaccination strategies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2022;146:112550. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.112550.
2. Popovic M. XBB.1.5 Kraken Cracked: Gibbs Energies of Binding and Biosynthesis of the XBB.1.5 Variant of SARS-Cov-2. *Preprints*. 2023;2023010404. DOI: 10.20944/preprints202301.0404.v1.
3. Parums D. V. The XBB. 1.5 ('Kraken') Subvariant of Omicron SARS-CoV-2 and its Rapid Global Spread. Medical Science Monitor: International Medical. *Journal of Experimental and Clinical Research*. 2023;29:e939580. DOI: 10.12659/MSM.939580.
4. Lee C. C., Hsieh C. C., Ko W. C. Molnupiravir — A Novel Oral Anti-SARS-CoV-2 Agent. *Antibiotics*. 2021;10:1294. DOI: 10.3390/antibiotics10111294.
5. Pourkarim F., Pourtaghi-Anvarian S., Rezaee H. Molnupiravir: A new candidate for COVID-19 treatment. *Pharmacology research & perspectives*. 2022;10(1):e00909. DOI: 10.1002/prp2.909.
6. Gordon C. J., Tchesnokov E. P., Schinazi R. F., Götte M. Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis via the RNA template. *Journal of Biological Chemistry*. 2021;297(1):100770. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100770.
7. Sharaf Y. A., El Deeb S., Ibrahim A. E., Al-Harrasi A., Sayed R. A. Two green micellar HPLC and mathematically assisted UV spectroscopic methods for the simultaneous determination of molnupiravir and favipiravir as a novel combined COVID-19 antiviral regimen. *Molecules*. 2022;27(7):2330. DOI: 10.3390/molecules27072330.
8. Balakin K. V., Storozhenko R. V., Jakubova E. V. Favipiravir for the treatment of COVID-19. *Nauchnyj bjulleten' HimRar*. 2023;1. (In Russ.)
9. Eloy P., Le Grand R., Malvy D., Guedj J. Combined treatment of molnupiravir and favipiravir against SARS-CoV-2 infection: One+ zero equals two? *EBioMedicine*. 2021;74:103663. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103663.
10. Gouda A. S., Marzouk H. M., Rezk M. R., Salem A. M., Morsi M. I., Nouman E. G., Abdallah Y. M., Hassan A. Y., Abdel-Megied A. M. A validated LC-MS/MS method for determination of antiviral prodrug molnupiravir in human plasma and its application for a pharmacokinetic modeling study in healthy Egyptian volunteers. *Journal of Chromatography B*. 2022;1206:123363. DOI: 10.1016/j.jchromb.2022.123363.
11. Amara A., Penchala S. D., Else L., Hale C., FitzGerald R., Walker L., Lyons R., Fletcher T., Khoo S. The development and validation of a novel LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of Molnupiravir and its metabolite β -d-N4-hydroxycytidine in human plasma and saliva. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2021;206:114356. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114356.
12. Parsons T. L., Kryszak L. A., Marzinke M. A. Development and validation of assays for the quantification of β -D-N4-hydroxycytidine in human plasma and β -D-N4-hydroxycytidine-triphosphate in peripheral blood mononuclear cell lysates. *Journal of Chromatography B*. 2021;1182:122921. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122921.