

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239>
УДК 615.03



Оригинальная статья / Research article

Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС

Т. Н. Комаров^{1, 2}, П. А. Карпова^{1✉}, О. А. Арчакова¹, Д. С. Щелгачева¹,
П. К. Карнакова¹, Н. С. Багаева¹, К. Я. Заславская³, П. А. Белый³, И. Е. Шохин¹

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Центр фармацевтической аналитики». 117149, Россия, г. Москва, Симферопольский бульвар, д. 8

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» (РУДН), 117198, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

³ Общество с ограниченной ответственностью «ПРОМОМЕД РУС», 129090, Россия, г. Москва, Проспект Мира, д. 13 стр. 1

✉ Контактное лицо: Карпова Полина. А. E-mail: p.karpova@cpha.ru

ORCID: Т. Н. Комаров – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; П. А. Карпова – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; О. А. Арчакова – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>;
Д. С. Щелгачева – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; П. К. Карнакова – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Н. С. Багаева – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>;
К. Я. Заславская – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>; П. А. Белый – <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>; И. Е. Шохин – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Статья поступила: 14.07.2023

Статья принята в печать: 18.08.2023

Статья опубликована: 25.08.2023

Резюме

Введение. Одним из наиболее известных препаратов широкого спектра действия против многих РНК-вирусов, в том числе и вируса тяжелого острого респираторного синдрома 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] является фавипиравир. За счет своей структуры фавипиравир встраивается в РНК вируса и блокирует его дальнейшую репликацию в клетке организма человека. Также фавипиравир указан в перечне жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что подтверждает значимость для российского здравоохранения этого лекарственного средства в борьбе с распространенными РНК-вирусами. Нами уже были опубликованы биоаналитические методики определения фавипиравира в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектором (ВЭЖХ-УФ) с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении (аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 флаконе лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий) и методом ВЭЖХ с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) с целью изучения фармакокинетики β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира при их совместном определении в плазме крови при пероральном введении (аналитический диапазон методики составил 250,00–20000,00 нг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 таблетке). Ожидание низких значений концентраций фавипиравира (в данном исследовании дозировка фавипиравира в рассматриваемых лекарственных средствах составляет 200 мг в 1 таблетке) и, в связи с этим расширение диапазона за счет снижения значения нижнего предела количественного определения (НПКО), применяемого в данном исследовании, обуславливает необходимость разработки другой методики. Поэтому в настоящем исследовании освещается разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл.

Цель. Разработка и валидация методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС для дальнейшего исследования фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств фавипиравира является целью настоящего исследования.

Материалы и методы. В процессе пробоподготовки использовался способ осаждения белков метанолом. Раствор меченного стабильными изотопами фавипиравира-13C3 применялся как внутренний стандарт, подвижной фазой служили 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (элюент А) и метанол (элюент В). Хроматографическая колонка – Phenomenex Kinetex C18, 100 × 3,0 мм. Определение фавипиравира в плазме крови человека проводили методом ВЭЖХ посредством тандемного масс-спектрометрического детектора с тройным квадруполом. Аналитический диапазон для фавипиравира – 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека.

Результаты и обсуждение. Проведение валидации разработанной методики было осуществлено по следующим параметрам: селективность, калибровочная кривая, точность, прецизионность, эффект матрицы, перенос пробы, степень извлечения, НПКО, стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов аналита; краткосрочная стабильность; стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочная стабильность аналита в матрице).

Заключение. Разработана и валидирована методика количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови человека. Данная методика позволяет использовать ее для аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных средств, содержащих фавипиравир, с целью расширения их ассортимента на отечественном фармацевтическом рынке.

Ключевые слова: фавипиравир, плазма, COVID-19, валидация, ВЭЖХ-МС/МС, фармакокинетика, биоэквивалентность

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 и П. А. Карпова участвовали в разработке и валидации биоаналитической методики. П. К. Карнакова занималась подготовкой проб к работе. Н. С. Багаева отвечала за статистическую обработку полученных данных. И. Е. Шохин, К. Я. Заславская и П. А. Белый обеспечивали организацию исследования. Все вышеуказанные авторы участвовали в обсуждении полученных результатов в форме научной дискуссии.

Для цитирования: Комаров Т. Н., Карпова П. А., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Карнакова П. К., Багаева Н. С., Заславская К. Я., Белый П. А., Шохин И. Е. Определение фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(3):229–239. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239>

Determination of Favipiravir in Human Blood Plasma by HPLC-MS/MS

Timofey N. Komarov^{1,2}, Polina A. Karpova¹✉, Olga A. Archakova¹,
Dana S. Shchelgacheva¹, Polina K. Karnakova¹, Natalia S. Bagaeva¹,
Kira Ya. Zaslavskaya³, Petr A. Bely³, Igor E. Shohin¹

¹ LLC "Center for Pharmaceutical Analytics", 8, Simferopolsky Boulevard, Moscow, 117149, Russia

² Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba (RUDN University), 6, Mikluho-Maklaya str., Moscow, 117198, Russia

³ LLC «PROMOMED RUS», 13/1, Prospekt Mira, Moscow, 129090, Russia

✉ Corresponding author: Polina A. Karpova. E-mail: p.karpova@cpha.ru

ORCID: Timofey N. Komarov – <https://orcid.org/0000-0001-8354-7877>; Polina A. Karpova – <https://orcid.org/0000-0001-6777-5976>; Olga A. Archakova – <https://orcid.org/0000-0001-6621-1060>; Dana S. Shchelgacheva – <https://orcid.org/0000-0003-4894-7001>; Polina K. Karnakova – <https://orcid.org/0000-0002-7518-0777>; Natalia S. Bagaeva – <https://orcid.org/0000-0001-7496-8186>; Kira Ya. Zaslavskaya – <https://orcid.org/0000-0002-7348-9412>; Petr A. Bely – <https://orcid.org/0000-0001-5998-4874>; Igor E. Shohin – <https://orcid.org/0000-0002-1185-8630>.

Received: 14.07.2023

Revised: 18.08.2023

Published: 25.08.2023

Abstract

Introduction. Favipiravir is one of the most well-known broad-spectrum drugs against many RNA viruses, including the severe acute respiratory syndrome virus 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)]. Due to its structure, favipiravir is embedded in the RNA of the virus and blocks its further replication in the cell of the human body. Favipiravir is also included in the list of vital and essential medicines, which confirms the importance for Russian healthcare of this drug in the fight against common RNA viruses. We have already published bioanalytical methods for determining favipiravir in human blood plasma by high-performance liquid chromatography with an ultraviolet detector (HPLC-UV) in order to study the pharmacokinetics of favipiravir with parenteral administration (the analytical range of the technique was 0.25–200.00 µg/ml for the dosage of favipiravir 400 mg in 1 vial of lyophilizate for the preparation of concentrate for the preparation of solution for infusions) and by HPLC with tandem mass-selective detection (HPLC-MS/MS) in order to study the pharmacokinetics of β-D-N4-hydroxycytidine and favipiravir in their joint determination in blood plasma with oral administration (the analytical range of the technique was 250.00–20000.00 ng/ml for the dosage of favipiravir 400 mg in 1 tablet). The expectation of low favipiravir's concentrations (the dosage of favipiravir in the drugs in question is 200 mg in 1 tablet in this study) and, in this regard, the expansion of the range by reducing the value of the lower limit of quantitative determination (LLOQ) used in this study necessitates the development of another method. Therefore, this study is given the development and validation of a method for determining favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS with an analytical range of 50.00–15000.00 ng/ml.

Aim. The aim of this study is to develop a method for quantitative determination of favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS for further for further researches of pharmacokinetics and bioequivalence of drugs.

Materials and methods. In the process of sample preparation, a method of proteins precipitation with methanol was used. A solution labeled with stable isotopes of favipiravir-13C3 was used as an internal standard, the mobile phase was a 0.1 % solution of formic acid in water (eluent A) and methanol (eluent B). Chromatographic column – Phenomenex Kinetex C18, 100×3.0 mm. The determination of favipiravir in human blood plasma was carried out by HPLC using a tandem mass spectrometric detector with a triple quadrupole. The analytical range for favipiravir is 50.00–15000.00 ng/ml in human blood plasma.

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

Conclusion. A method of quantitative favipiravir's determination in human blood plasma by HPLC-MS/MS with a confirmed analytical range of 50.00–15000.00 ng/ml in human blood plasma has been developed and validated. This method allows using it for the analytical part of pharmacokinetics and bioequivalence studies of drugs containing favipiravir in order to expand their range in the domestic pharmaceutical market.

Keywords: favipiravir, human blood plasma, validation, COVID-19, validation, HPLC-MS/MS, pharmacokinetics, bioequivalence

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 Komarov, Olga A. Archakova, Dana S. Shchelgacheva and Polina A. Karpova participated in the development and validation of the bioanalytical methodology. Polina K. Karnakova was preparing samples for work. Natalia S. Bagaeva was responsible for the statistical processing of the received data. Igor E. Shohin, Kira Ya. Zaslavskaya and Petr A. Bely provided organization of the study. All the above authors participated in the discussion of the obtained results in the form of a scientific discussion.

For citation: Komarov T. N., Karpova P. A., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Karnakova P. K., Bagaeva N. S., Zaslavskaya K. Ya., Bely P. A., Shohin I. E. Determination of favipiravir in human blood plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2023;12(3):229–239. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-3-229-239>

ВВЕДЕНИЕ

Фавипиравир как противовирусное лекарственное средство широкого спектра действия изначально изучался в качестве средства терапии тяжелых инфекций, которые вызывают различные РНК-вирусы. К таким вирусам относят вирус гриппа, аренавирусы (Хунин, Мачупо и Пичинде), флэбовирусы (лихорадка Рифт-Вэлли, Пунта-Торо), хантавирусы (Мапорал, Добрава и Проспект-Хилл), флавивирусы (вирус жел-

той лихорадки и Западного Нила), энтеровирусы (вирус полиомиелита и риновирусы), альфавирус, парамиксовирус, респираторно-синцитиальный вирус и норовирусы. Однако вскоре после начала коронавирусной пандемии данное лекарственное средство стали рассматривать для лечения новой коронавирусной инфекции, вызванной вирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 [severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)] [1, 2].

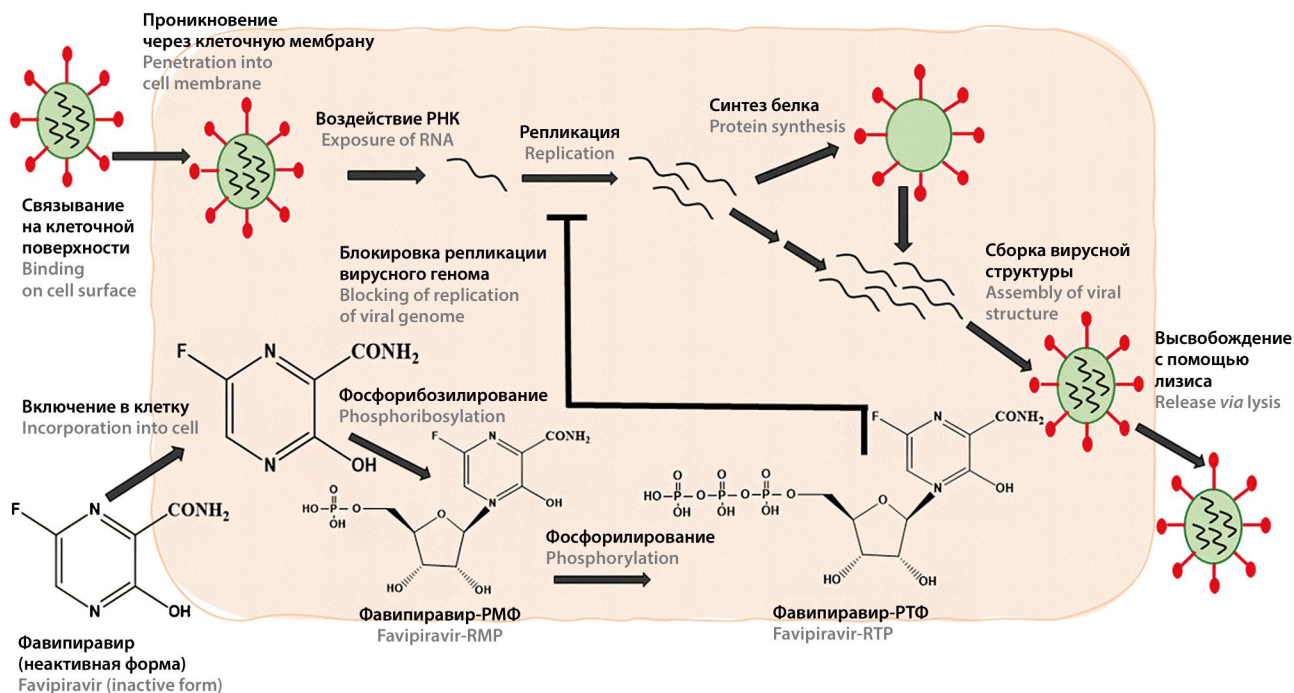


Рисунок 1. Схематическое представление механизма действия фавипиравира в клетке против вируса [6]

Figure 1. Schematic representation of the mechanism favipiravir's action [6]

Стоит отметить, что фавипиравир является пролекарством: при попадании в клетки организма человека молекула фавипиравира вследствие трансформации превращается в активную форму – рибозилтрифосфат. Благодаря образованию данной активной формы фавипиравира данное вещество относят к производным пиазина, которое после трансформации в клетке ингибирует синтез вирусной РНК. Ингибирование репликации вируса основано на включении активной формы молекулы фавипиравира в вирусную РНК ферментом РНК-зависимой РНК-полимеразой [RNA dependent RNA polymerase (RdRp)] и дальнейшем мутагенезе в дочерних РНК вируса (рисунок 1) [3–5].

Максимальная концентрация (C_{max}) фавипиравира в плазме крови человека наблюдается через 2 часа после приема внутрь, а затем быстро снижается. Период полувыведения ($t_{1/2}$) данного лекарственного средства составляет от 2 до 5,5 часов. Фавипиравир подвергается метаболизму в цитозоле печени, главным образом, альдегидоксидазой и частично ксантиноксидазой, с образованием неактивного метаболита (Т-705М1), которой затем выводится почками [5]. Основными нежелательными реакциями рассматриваемого препарата являются тератогенность и эмбриотоксичность. Поэтому фавипиравир не назначают беременным женщинам или женщинам, которые предположительно беременны. Другими нежелательными реакциями данного лекарственного препарата являются такие желудочно-кишечные расстройства как рвота, диарея, тошнота, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и функциональная диспепсия [6, 7].

надцатиперстной кишки и функциональная диспепсия [6, 7].

Фавипиравир входит в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов, что указывает на значимость данного лекарственного средства для российского здравоохранения в борьбе с распространенными РНК-вирусами¹.

В литературе опубликованы всевозможные исследования по определению фавипиравира в различных биологических жидкостях с целью проведения исследований фармакокинетики и биоэквивалентности. Для определения данного лекарственного средства в биологических объектах применяются методы сверхвысокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС) [ultra performance liquid chromatography – tandem mass-spectrometry (UPLC-MS/MS)], ультрафиолетовым детектированием

¹ Распоряжение Правительства РФ от 12 октября 2019 г. № 2406-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2023 год, перечня лекарственных препаратов для медицинского применения, в том числе лекарственных препаратов для медицинского применения, назначаемых по решению врачебных комиссий медицинских организаций, перечня лекарственных препаратов, предназначенных для обеспечения лиц, больных гемофилией, муковисцидозом, гипофизарным нанизмом, болезнью Гоше, а также минимального ассортимента лекарственных препаратов, необходимых для оказания медицинской помощи». (ред. от 30.03.2022). Доступно по: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_335635/. Ссылка активна на 15.07.2023.

(ВЭЖХ-УФ) [high performance liquid chromatography – ultraviolet detection (HPLC-UV)], а также с высокоэффективной жидкостной хроматографией с tandemным масс-спектрометрическим детектированием (ВЭЖХ-МС/МС) [high performance liquid chromatography – tandem mass-spectrometry (HPLC-MS/MS)] [8].

Рассмотренные биоаналитические методики определения фавипиравира методами ВЭЖХ с различными видами детектирования либо обладают низкой чувствительностью, либо требуют длительного времени анализа и больших объемов образца биологической матрицы. Способами пробоподготовки служат твердо-фазовая экстракция, осаждение белков различными органическими растворителями, осаждение с последующими разбавлением или жидкость-жидкостной экстракцией (ЖЖЭ) [liquid-liquid extraction (LLE)], жидкость-жидкостная экстракция. Также в методиках рассматриваются в качестве объекта исследований не только плазма крови человека, но и сыворотка крови, и грудное молоко человека (таблица 1).

До настоящего времени в литературных источниках не было опубликовано методик определения фавипиравира в плазме крови человека с использованием в качестве внутреннего стандарта (ВС) [internal standard (IS)], меченного стабильными изотопами фавипиравира – *фавипиравир-13С3*. Нами уже были разработаны методики определения фавипиравира

в плазме крови человека методом ВЭЖХ-УФ с целью изучения фармакокинетики фавипиравира при парентеральном введении (аналитический диапазон методики составил 0,25–200,00 мкг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 флаконе лиофилизата для приготовления концентрата для приготовления раствора для инфузий) [11] и совместного определения β-D-N4-гидроксицитидина и фавипиравира в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС при пероральном введении (аналитический диапазон методики составил 250,00–20000,00 нг/мл для дозировки фавипиравира 400 мг в 1 таблетке) [13]. В связи с тем, что концентрации фавипиравира в плазме крови ожидалось низкими для описанных выше аналитических диапазонов (в данном исследовании дозировка фавипиравира составляет 200 мг в 1 таблетке), то ранее используемый нами аналитический диапазон не подходил для данного исследования фармакокинетики и биоэквивалентности. Поэтому в настоящем исследовании приводится описание разработки и валидации методики определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС в аналитическом диапазоне 50,00–15000,00 нг/мл. В качестве пробоподготовки был использован простой и в то же время доступный способ осаждения белков метанолом, в качестве элюента А подвижной фазы является 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему), элюента В – метанол.

Таблица 1. Методики биоаналитических исследований количественного определения фавипиравира

Table 1. Bioanalytical methods of favipiravir quantitative determination

Аналитический метод Analytical method	Объект анализа Object	Примечания по пробоподготовке Sample preparation's notes	Аналитический диапазон Analytical range	Ссылка Reference
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека, грудное молоко человека Human plasma, human breast milk	Твердофазная экстракция Solid-phase extraction	0,50–20,00 мкг/мл 0.50–20.00 µg/mL	[9]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение трифторуксусной кислотой и последующая ЖЖЭ Protein precipitation of proteins with trifluoroacetic acid and subsequent LLE	0,10–100,00 мкг/мл 0.10–100.00 µg/mL	[10]
ВЭЖХ-УФ HPLC-UV	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение метанолом Protein precipitation with methanol	0,25–200,00 мкг/мл 0.25–200.00 µg/mL	[11]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	50,00–10000,00 нг/мл 50.00–10000.00 ng/mL	[12]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение 0,1%-м раствором муравьиной кислоты в ацетонитриле Protein precipitation with 0.1 % formic acid solution in acetonitrile	250,00–20000,00 нг/мл 250.00–20000.00 ng/mL	[13]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	0,048–50,000 мкг/мл 0.048–50.000 µg/mL	[14]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом с последующим разбавлением Protein precipitation with acetonitrile followed by dilution	500,00–50000,00 нг/мл 500.00–50000.00 ng/mL	[15]
СВЭЖХ-МС/МС UPLC-MS/MS	Плазма крови человека Human plasma	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	0,50–100,00 мкг/мл 0.50–100.00 µg/mL	[16]
ВЭЖХ-МС/МС HPLC-MS/MS	Сыворотка крови человека Human serum	Осаждение ацетонитрилом Protein precipitation with acetonitrile	1,60–600,00 мкг/мл 1.60–600.00 µg/mL	[17]

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Оборудование

Хроматографическое разделение и детектирование было проведено на высокоэффективном жидкостном хроматографе Nexera XR с tandemным масс-спектрометрическим детектором с тройным квадруполем LCMS-8040 (Shimadzu Corporation, Япония), оснащенном термостатом колонок и образцов, вакуумным дегазатором, краном переключения линии потока высокого давления (FCV-20AH2), автосамплером и устройством автоматической подачи образцов в автодозатор (Rack Changer II). Обработку первичных данных осуществляли при помощи программного обеспечения LabSolutions (ver. 5.91) (Shimadzu Corporation, Япония) [8, 18].

Реактивы и растворы

В исследовании были использованы следующие реактивы:

- ацетонитрил (класс «х.ч.», ООО «ТД ХИММЕД», Россия);
- муравьиная кислота (класс «for analysis», PanReac, Испания);
- метанол (класс «х.ч.», ООО «ТД ХИММЕД», Россия);
- вода деминерализованная, класс чистоты I.

Для приготовления исходных и рабочих растворов были использованы субстанции фавипиравира (АО «Биохимик», Россия, содержание 100,40 %) и фавипиравира-13С3 [Toronto Research Chemicals Inc., Канада, содержание 98,42 % (ВЭЖХ чистота) и 98,20 % (изотопная чистота)].

Исходный стандартный раствор фавипиравира был приготовлен путем растворения точной навески субстанции в ацетонитриле класса «х.ч.». Рабочие стандартные растворы были приготовлены разведением аликвоты исходного стандартного раствора тем же растворителем в соответствии с таблицами 2 и 3.

При приготовлении рабочего стандартного раствора ВС фавипиравира-13С3 точную навеску стандартного образца фавипиравира-13С3 количественно переносили в мерную колбу и растворяли также в ацетонитриле класса «х.ч.».

Хранение образцов интактной плазмы крови, исходные и рабочие стандартные растворы было при температуре от –50 до –35 °С в морозильной камере.

Пробоподготовка

К помещенной в микропробирки типа «Эппендорф» аликвоте 200 мкл калибровочного образца (КО), образца контроля качества (КК) или образца интактной плазмы крови прибавляли 10 мкл рабочего стандартного раствора ВС, прибавляли 400 мкл осадителя. Затем раствор перемешивали на встряхивателе типа «Вортекс» в течение 10 секунд, далее центрифугировали с ускорением 15000 g в течение 15 минут. После данных этапов пробоподготовки супернатант

переносили в хроматографические виалы и помещали в лотки автодозатора Rack Changer II хроматографа.

Таблица 2. Концентрации фавипиравира и фавипиравира-13С3 в калибровочных образцах

Table 2. Concentrations of favipiravir and favipiravir-13C3 at calibration levels

Уровень Level	Концентрация фавипиравира, нг/мл Favipiravir concentration, ng/mL	Концентрация фавипиравира-13С3, нг/мл Favipiravir-13C3 concentration, ng/mL
1	50,00	1283,74
2	100,00	
3	500,00	
4	1000,00	
5	2500,00	
6	5000,00	
7	10000,00	
8	15000,00	

Таблица 3. Концентрации фавипиравира и фавипиравира-13С3 в образцах контроля качества (КК)

Table 3. Concentrations of favipiravir and favipiravir-13C3 at quality control (QC) samples

Уровень Level	Концентрация фавипиравира, нг/мл Favipiravir concentration, ng/mL	Концентрация фавипиравира-13С3, нг/мл Favipiravir-13C3 concentration, ng/mL	Примечания Notes
LLOQ	50,00	1283,74	LLOQ – нижний предел количественного определения. L – низкий уровень концентрации M1 и M2 – средние уровни концентраций. H – высокий уровень концентрации LLOQ – lower limit of quantification. L – low level of concentration. M1 and M2 – middle levels of concentration. H – high level of concentration
L	150,00		
M1	3000,00		
M2	7500,00		
H	12000,00		

Условия хроматографического разделения и детектирования

- **Хроматографическая колонка:** Phenomenex Kinetex C18, 100 × 3.0 mm, 5 μm.
- **Предколонка:** Phenomenex SecurityGuard™. Cartridges Widespore C18 4x3,0 mm.
- **Температура термостата колонки:** 40 °С.
- **Подвижная фаза:** 0,1%-й раствор муравьиной кислоты в воде (по объему) (элюент А); метанол (элюент В).

- Скорость потока подвижной фазы: 0,85 мл/мин.
- Градиент состава подвижной фазы представлен на рисунке 2.
- Объем пробы при вводе: 10 мкл.
- Время удерживания фавипиравира и фавипиравира-13С3: около 1,2 мин.
- Время регистрации хроматограммы: 0,0–3,75 мин.
- Напряжение на капилляре электроспрея, режим ионизации и условия детектирования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Масс-спектрометрические условия детектирования фавипиравира и фавипиравира-13С3

Table 4. Mass-spectrometric conditions of favipiravir and favipiravir-13C3

	Условия детектирования Detection conditions	Напряжение на капилляре электроспрея Electrospray capillar voltage	Режим ионизации Ion mode
ФАВ FAV	156,20 → 113,10 m/z 156,20 → 65,00 m/z 156,20 → 58,20 m/z	–4,9 kV	Отрицательный Negative
ФАВ-13С3 FAV-13C3	159,15 → 115,05 m/z 159,15 → 86,10 m/z		

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка биоаналитической методики

В рамках разработки при выборе ВС опирались на сходство по структурным и физико-химическим свойствам с анализируемым веществом, что может занимать достаточное количество времени. Поэтому в

качестве ВС был выбран меченный стабильными изотопами фавипиравир – фавипиравир-13С3.

Во время разработки условий масс-спектрометрического детектирования были определены прекурсор-ионы, образующиеся в режиме отрицательной ионизации, и дочерние ионы фавипиравира и фавипиравира-13С3, получаемые при разнообразных энергиях соударения. Также была проведена оптимизация напряжений в оптической системе масс-спектрометрического детектора с целью увеличения интенсивности сигналов. В качестве источника ионизации был использован электроспрей.

После разработки условий масс-спектрометрического детектирования фавипиравира и фавипиравира-13С3 приступили к подбору подходящих для их разделения хроматографической колонки, подвижной фазы, а также градиента состава подвижной фазы. Благодаря подобранным условиям хроматографического разделения времени удерживания фавипиравира и фавипиравира-13С3 были получены около 1,2 минуты для обоих веществ, что дало возможность разработать короткую по времени методику. Также удалось достигнуть эффективного разделения веществ с компонентами матрицы и получить оптимальную форму хроматографических пиков аналита и ВС.

В качестве осадителя был выбран метанол, так как он обеспечивал наиболее полное осаждение белков плазмы крови человека. Независимо от того, что в литературных источниках приводятся другие разнообразные способы пробоподготовки, выбранный нами способ позволил облегчить данный этап и получить методику, соответствующую актуальным требованиям нормативной документации.

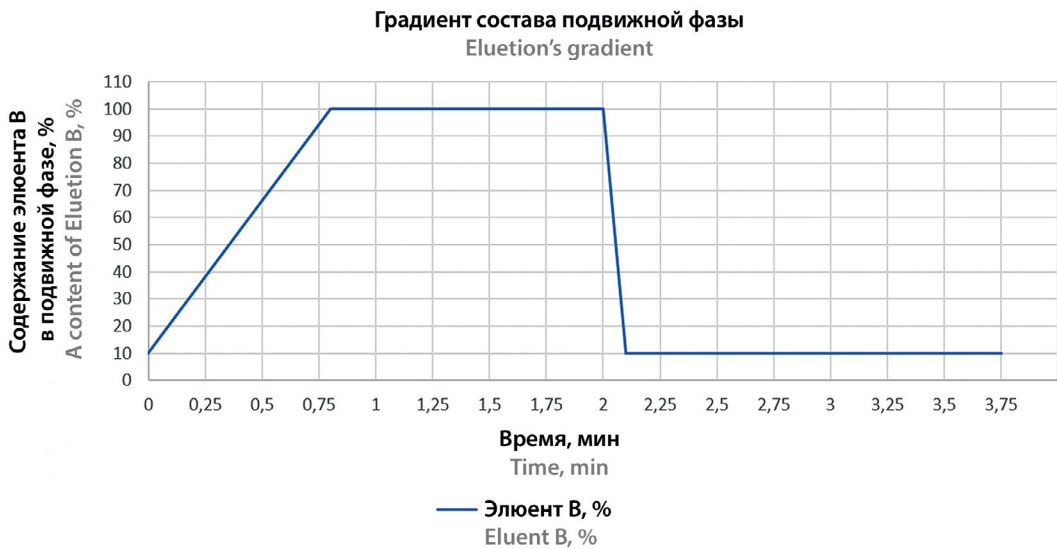


Рисунок 2. Градиент состава подвижной фазы

Figure 2. Elution's gradient

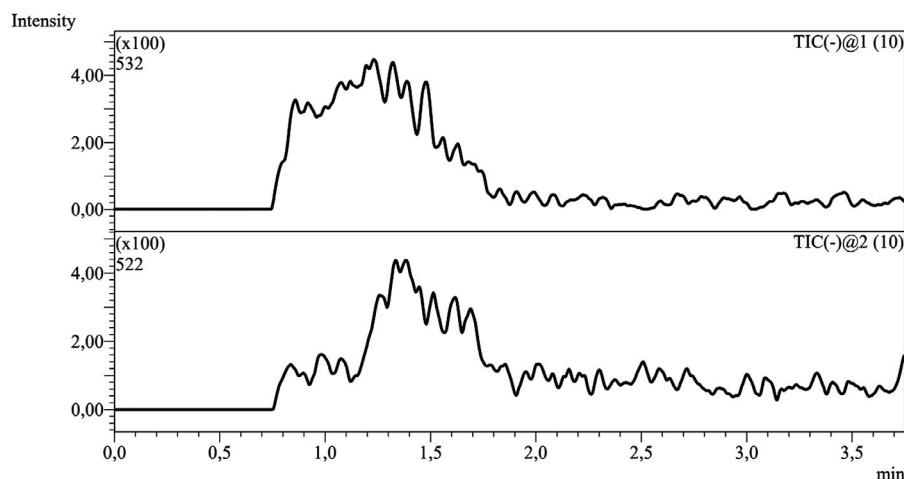


Рисунок 3. Хроматограмма образца интактной плазмы крови (пример)

Figure 3. Blank human blood plasma sample chromatogram (example)

Валидация биоаналитической методики

Валидация методики определения фавипиравира была проведена в рамках исследования фармакокинетики и биоэквивалентности в плазме крови человека, следуя правилами проведения исследований биоэквивалентности лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза¹, а также руководствами EMA² и FDA³, по таким параметрам как селективность, калибровочная кривая, эффект матрицы, точность и прецизионность на уровнях LLOQ, L, M1, M2, H (таблица 3) как внутри циклов, так и между циклами, степень извлечения (СИ), перенос пробы, нижний предел количественного определения (НПКО), стабильность (стабильность исходных и рабочих стандартных растворов анализируемого вещества; краткосрочная стабильность («настолярная» и «постпрепаративная»); стабильность при трехкратной заморозке-разморозке; долгосрочная стабильность аналита в матрице) [8, 18].

Селективность

При оценки данного параметра валидации был проведен анализ образцов интактной, гиперлипидемической интактной и гемолизной интактной плазмы

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 15.07.2023.

² European Medicines Agency. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. Assessed: 15.07.2023.

³ Food and Drug Administration. Available at: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>. Assessed: 15.07.2023.

крови, полученных из различных источников ($n = 6$), а также образцов с прибавлением рабочего стандартного раствора фавипиравира № 1 и рабочего стандартного раствора ВС (см. таблицу 2).

На хроматограммах образцов интактной плазмы крови сигналы пиков, соответствующих временам удерживания фавипиравира и фавипиравира-13С3, не превышали допустимые предписания критериев приемлемости: не более +20 % от сигнала на уровне НПКО и не более +5 % от сигнала ВС соответственно. Пример хроматограммы образца интактной плазмы крови приведен на рисунке 3.

Калибровочная кривая

Проводили анализ калибровочных образцов ($n = 8$), приготовленных на интактной плазме крови с добавлением и рабочих стандартных растворов фавипиравира и рабочего стандартного раствора фавипиравира-13С3 для того, чтобы получить соответствующие уровням 1–8 концентрации аналита и ВС (таблица 2).

Калибровочные графики были построены по найденным данным в координатах отношение площади пика фавипиравира к площади пика фавипиравира-13С3 от отношения концентрации фавипиравира к концентрации фавипиравира-13С3 в плазме крови человека (пример калибровочного графика приведен на рисунке 4).

Калибровочные кривые имели линейную зависимость, и полученные коэффициенты корреляции соответствовали предписанию (не менее 0,99). По уравнению линейной зависимости были рассчитаны отклонения концентраций КО от номинальных значений. Полученные отклонения не выходили за пределы критериев приемлемости: не более +20 % для 1 уровня калибровочной кривой (НПКО) и не более +15 % для уровней 2–8.

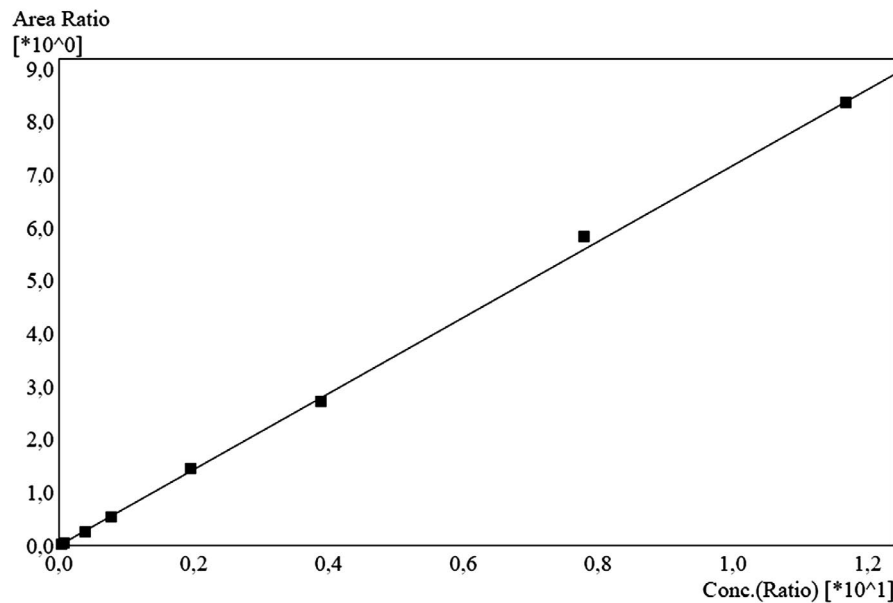


Рисунок 4. Калибровочный график (пример)
Figure 4. Calibration curve (example)

Эффект матрицы

Для изучения данного параметра были приготовлены образцы интактной, гиперлипидемической интактной и гемолизной интактной плазмы крови без учета влияния степени извлечения из интактной плазмы крови ($n=6$) и без влияния интактной плазмы крови ($n=6$) на уровнях L и H (таблица 3). Эффект матрицы для фавипиравира-13С3 был рассчитан на уровне концентрации 1283,74 нг/мл.

Относительное стандартное отклонение (RSD, %) фактора матрицы, нормализованного по ВС, не превышало 15 % на уровнях L и H (таблица 5).

Точность и прецизионность

Была проведена оценка образцов КК, соответствующие уровням LLOQ, L, M1, M2 и H (см. таблицу 3). Данный анализ проводили по 5 вводов образца КК для каждого из 5 уровней концентраций фавипиравира в рамках 3 валидационных циклов.

Точность и прецизионность методики анализировались внутри циклов, а также между циклами. По найденным значениям концентраций фавипиравира были рассчитаны величины RSD и относительной погрешности (E, %). Найденные данные соответствовали критериям приемлемости: не более 15 % для уровней L, M1, M2 и H и не более 20 % для уровня LLOQ (таблица 6).

Степень извлечения

Для того, чтобы оценить данный параметр валидации, анализировали по 3 образца, приготовленных из интактной, гиперлипидемической интактной и ге-

молизной интактной плазмы крови без влияния СИ из интактной плазмы крови на уровнях L, M1, M2 и H (таблица 3), а также образцы КК, приготовленные на различных интактных матрицах. В таблице 7 представлены полученные данные. RSD рассчитанных значений СИ фавипиравира из разных видов рассматриваемых нами биологических матриц не выходило за пределы предписания (не более +15 %).

Таблица 5. Расчет фактора матрицы фавипиравира на уровнях L и H, нормализованного по фактору матрицы фавипиравира-13С3 для образцов, приготовленных из разнообразных видов интактной плазмы крови

Table 5. Calculation of the favipiravir matrix factor at L and H levels, normalized by the favipiravir-13C3 matrix factor for samples prepared from diverse types of intact plasma

Вид биологической матрицы Type of biological matrix	Уровень контроля качества Level of QC	Введено, нг/мл Injected, ng/mL	RSD, %
Интактная плазма крови человека Human blank plasma	L	150,00	5,30
	H	12000,00	4,07
Гемолизная интактная плазма крови человека Human hemolyzed blank plasma	L	150,00	12,02
	H	12000,00	2,77
Гиперлипидемическая интактная плазма крови человека Human lipemic blank plasma	L	150,00	7,48
	H	12000,00	3,01

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

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

Уровень Level	Введено, нг/мл Injected, ng/mL	RSD, %			E, %		
		Внутри цикла (n = 5) Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами n = 10 Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами n = 15 Intra-day 2 (n = 15)	Внутри цикла (n = 5) Inter-day (n = 5)	Между двумя циклами n = 10 Intra-day 1 (n = 10)	Между тремя циклами n = 15 Intra-day 2 (n = 15)
LLOQ	50,00	17,69	18,64	16,07	-15,72	-4,48	-7,31
L	150,00	3,27	5,80	6,55	-7,87	-5,24	-4,24
M1	3000,00	1,28	7,17	7,14	2,86	-0,57	1,68
M2	7500,00	1,50	5,98	6,62	-2,40	-7,26	-5,34
H	12000,00	2,74	3,06	3,28	-0,99	0,93	1,96

Таблица 7. Оценка СИ фавипиравира на уровнях L, M1, M2 и H из разных видов биологических матриц

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

Вид биологической матрицы Type of biological matrix	СИ фавипиравира, % Favipiravir recovery %			
	L	M1	M2	H
Интakтная плазма крови Blank human blood plasma	91,97	95,45	96,44	101,65
	81,25	98,17	98,59	97,86
	107,76	99,24	103,92	105,00
Гемолизная интактная плазма крови Hemolyzed blank human blood plasma	106,62	103,53	99,67	103,70
	94,74	108,69	100,09	108,04
	82,84	111,02	106,43	106,52
Гиперлипидемическая интактная плазма крови Lipemic blank human blood plasma	111,23	100,92	105,13	114,77
	104,22	110,49	100,73	114,32
	115,28	109,36	98,87	116,44
Среднее Average	99,60			
RSD, %	4,90			

Перенос пробы

В процессе последовательного анализа КО, соответствующих уровню концентраций фавипиравира 8 (см. таблицу 2), и образцов интактной плазмы на хроматограмме образцов интактной плазмы не были идентифицированы пики, соответствующие по временам удерживания пикам фавипиравира и ВС.

Нижний предел количественного определения

НПКО методики определяли на основании данных калибровочной кривой, точности и прецизионности. НПКО методики – это самая минимальная концентрация фавипиравира в плазме крови в вышеуказанном аналитическом диапазоне, для которой возможно количественное определение анализируемого вещества со значениями RSD и E, не выходящими за пределы +20 %. Нижний предел количественного определения разработанной методики составил 50,00 нг/мл.

Пример хроматограммы плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО приведен на рисунке 5.

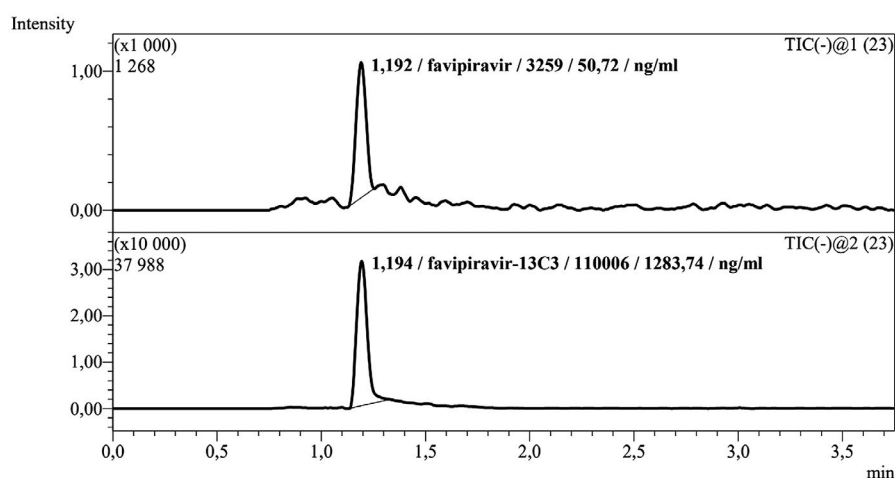


Рисунок 5. Хроматограмма плазмы крови с содержанием фавипиравира на уровне НПКО (пример)

Figure 5. Chromatogram of human blood plasma with favipiravir content at the level of LLOQ (example)

Стабильность

На уровнях концентраций фавипиравира L (150,00 нг/мл) и H (12000,00 нг/мл) были подтверждены следующие виды стабильности: стабильность при трехкратной заморозке-разморозке, краткосрочная стабильность («насто́льная» и «постпрепаративная»), стабильность исходных и рабочих стандартных растворов фавипиравира (при температуре хранения от –50 до –35 °С в течение 47 дней), долгосрочная стабильность фавипиравира в составе плазмы крови человека (при температуре хранения от –50 до –35 °С в течение 47 дней).

Для полученных значений концентраций фавипиравира была рассчитана относительная погрешность. Анализируемое вещество стабильно в указанных условиях, так как относительная погрешность значений результатов анализа находилась в пределах +15 % от соответствующих контрольных значений на уровнях L и H (см. таблицу 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и валидирована методика количественного определения фавипиравира в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС с подтвержденным аналитическим диапазоном 50,00–15000,00 нг/мл в плазме крови. Данная методика позволяет применять ее для аналитической части исследований фармакокинетики и биоэквивалентности лекарственных препаратов, содержащих фавипиравир, с целью расширения их ассортимента на отечественном фармацевтическом рынке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Балакин К.В., Стороженко Р.В., Якубова Е.В. Фавипиравир как средство терапии COVID-19. *Научный бюллетень ХимРар*. 2023;1:1–26.
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. *Antiviral research*. 2013;100(2):446–454. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
3. Peng Q., Peng R., Yuan B., Wang M., Zhao J., Fu L., Qi J., Shi Y. Structural Basis of SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir. *The Innovation*. 2021;2(1):100080. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100080.
4. Shannon A., Selisko B., Le NTT, Huchting J., Touret F., Piorkowski G., Fattorini V., Ferron F., Decroly E., Meier C., Coutard B., Peersen O., Canard B. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase. *BioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.05.15.098731.
5. Du Y. X., Chen X. P. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns about Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
6. Sood S., Bhatia G. K., Seth P., Kumar P., Kaur J., Gupta V., Punia S., Tuli H. S. Efficacy and Safety of New and Emerging Drugs for COVID-19: Favipiravir and Dexamethasone. *Current Pharmacology Reports*. 2021;7:49–54. DOI: 10.1007/s40495-021-00253-w.
7. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoto Sh., Kszynski R. H., Takemoto M. Antiviral Therapy for COVID-19: Derivation of Optimal Strategy Based on Past Antiviral and Favipiravir Experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
8. Карнакова П. К., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Алешина А. В., Багаева Н. С., Карпова П. А., Шохин И. Е. Совместное определение кандесартана и гидрохлоротиазида в плазме крови человека методом ВЭЖХ-МС/МС. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):177–189. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189.

9. Tiris G., Gazioglu I., Furton K. G., Kabir A., Locatelli M. Fabric Phase Sorptive Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Favipiravir in Human Plasma and Breast Milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;223:115131. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115131.
10. Abdallah I. A., Hammad Sh. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthyl-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.
11. 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.
12. Abd Allah F. I., Abdelhmaid A., Himida M., Elkashlan A. M., El-Attar A.-A. M. M. Fully Validated UPLC–MS/MS Method for Quantifying Favipiravir in Human Plasma Boosted Lean Six Sigma: An Application For a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(9): e5381. DOI: 10.1002/bmc.5381.
13. 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
14. 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.
15. Challenger E., Penchala S. D., Hale C., Fitzgerald R., Walker L., Reynolds H., Chiong J., Fletcher T., Khoo S., Else L. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;233:115436. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115436.
16. Bekegnan C. P., Driouich J. S., Breuer J., Barthelemy K., Giocanti M., Lamballerie de X., Kreins A. Y., Nougaiere A., Solas C. Simultaneous Quantitation of Favipiravir and its Hydroxide Metabolite in Human Plasma and Hamster Matrices Using a UPLC–MS/MS Method. *Biomedical Chromatography*. 2023;37(9): e5689. DOI: 10.1002/bmc.5689.
17. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevic G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.
18. Алешина А. В., Комаров Т. Н., Арчакова О. А., Щелгачева Д. С., Багаева Н. С., Давыданова В. В., Савченко А. Ю., Шохин И. Е. Определение транексамовой кислоты в плазме крови человека методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):120–127. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127.

REFERENCES

1. Balakin K. V., Storozhenko R. V., Yakubova E. V. Favipiravir as a Means of Therapy of COVID-19. *Nauchnyy bulletin. Scientific Bulletin of Chemrar*. 2023;1:1–26. (In Russ.)
2. Furuta Y., Gowen B. B., Takahashi K., Smee D. F., Barnard D. L. Favipiravir (T-705), a Novel Viral RNA Polymerase Inhibitor. *Antiviral research*. 2013;100(2):446–454. DOI: 10.1016/j.antiviral.2013.09.015.
3. Peng Q., Peng R., Yuan B., Wang M., Zhao J., Fu L., Qi J., Shi Y. Structural Basis of SARS-CoV-2 Polymerase Inhibition by Favipiravir. *The Innovation*. 2021;2(1):100080. DOI: 10.1016/j.xinn.2021.100080.
4. Shannon A., Selisko B., Le NTT, Huchting J., Touret F., Piorkowski G., Fattorini V., Ferron F., Decroly E., Meier C., Coutard B., Peersen O., Canard B. Favipiravir strikes the SARS-CoV-2 at its Achilles heel, the RNA polymerase. *BioRxiv*. 2020. DOI: 10.1101/2020.05.15.098731.

5. Du Y. X., Chen X. P. Favipiravir: Pharmacokinetics and Concerns about Clinical Trials for 2019-nCoV Infection. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. 2020;108(2):242–247. DOI: 10.1002/cpt.1844.
6. Sood S., Bhatia G. K., Seth P., Kumar P., Kaur J., Gupta V., Punia S., Tuli H. S. Efficacy and Safety of New and Emerging Drugs for COVID-19: Favipiravir and Dexamethasone. *Current Pharmacology Reports*. 2021;7:49–54. DOI: 10.1007/s40495-021-00253-w.
7. Shiraki K., Sato N., Sakai K., Matsumoto Sh., Kszynski R. H., Takemoto M. Antiviral Therapy for COVID-19: Derivation of Optimal Strategy Based on Past Antiviral and Favipiravir Experiences. *Pharmacology & Therapeutics*. 2022;235:108121. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2022.108121.
8. Karnakova P. K., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Aleshina A. A., Bagaeva N. S., Karpova P. A., Shohin I. E. Simultaneous Determination of Candesartan and Hydrochlorothiazide in Human Plasma by HPLC-MS/MS. *Drug development & registration*. 2021;10(4):177–189. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-177-189.
9. Tiris G., Gazioglu I., Furton K. G., Kabir A., Locatelli M. Fabric Phase Sorptive Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography for the Determination of Favipiravir in Human Plasma and Breast Milk. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;223:115131. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.115131.
10. Abdallah I. A., Hammad Sh. F., Bedair A., Mansour F. R. Menthyl-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.
11. 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.
12. Abd Allah F. I., Abdelhmaid A., Himida M., Elakashlan A. M., El-Attar A.-A. M. M. Fully Validated UPLC-MS/MS Method for Quantifying Favipiravir in Human Plasma Boosted Lean Six Sigma: An Application For a Bioequivalence Study. *Biomedical Chromatography*. 2022;36(9): e5381. DOI: 10.1002/bmc.5381.
13. Komarov T. N., Karnakova P. K., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Shohin I. E., Zaslavskaya K. Y., 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.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-1-215-226.
14. Onmaz D. E., Abusoglu S., Omnaz 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.
15. Challenger E., Penchala S. D., Hale C., Fitzgerald R., Walker L., Reynolds H., Chiong J., Fletcher T., Khoo S., Else L. Development and Validation of an LC-MS/MS Method for Quantification of Favipiravir in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2023;233:115436. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115436.
16. Bekegnran C. P., Driouich J. S., Breuer J., Barthelemy K., Giocanti M., Lamballerie de X., Kreins A. Y., Nougaiere A., Solas C. Simultaneous Quantitation of Favipiravir and its Hydroxide Metabolite in Human Plasma and Hamster Matrices Using a UPLC-MS/MS Method. *Biomedical Chromatography*. 2023;37(9): e5689. DOI: 10.1002/bmc.5689.
17. Sağlam O., Demiray G., Güney B., Doğan-Kurtoğlu E., Ulusoy M. G., Saraner N., Sevcı G., Nacak M., Erenmemişoğlu A., Tüzer V. Single Dose, Two-way Crossover Bioequivalence Study of Favipiravir Tablet in Healthy Male Subjects. *Journal of Pharmacy and Drug Development*. 2020;2(2):1–9. DOI: 10.5281/zenodo.4361817.
18. Aleshina A. V., Komarov T. N., Archakova O. A., Shchelgacheva D. S., Bagaeva N. S., Davydanova V. V., Savchenko A. Yu., Shohin I. E. Development and Validation of Tranexamic Acid Determination in Human Plasma by HPLC-MS/MS method. *Drug development & registration*. 2021;10(2):120–127. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-120-127.