



Разработка и валидация методики количественного определения субстанции аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии

М. А. Мандрик^{1,2}✉, И. А. Садковский^{1,2}, Е. Д. Пинегина¹, Л. А. Король¹, И. И. Краснюк¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет). 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Ордена Трудового Красного Знамени Институт нефтехимического синтеза им. А. В. Топчиева Российской академии наук (ИНХС РАН). 119991, г. Москва, Ленинский проспект, д. 29

✉ **Контактное лицо:** Мандрик Марк Александрович. **E-mail:** mandrik_m_a@staff.sechenov.ru

ORCID: М. А. Мандрик – <https://orcid.org/0000-0002-3558-9615>;
И. А. Садковский – <https://orcid.org/0000-0001-8375-9909>;
Е. Д. Пинегина – <https://orcid.org/0009-0001-7890-0821>;
Л. А. Король – <https://orcid.org/0000-0001-5919-1866>;
И. И. Краснюк – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Статья поступила: 14.02.2024

Статья принята в печать: 05.08.2024

Статья опубликована: 09.08.2024

Резюме

Введение. Дарунавир, являясь эффективным средством антиретровирусной терапии, широко применяется в клинической практике, в том числе для лечения педиатрических пациентов и беременных женщин, а также в качестве инструмента персонализированной терапии. При этом в производстве готовых лекарственных форм в настоящее время используется дарунавир как в виде кристаллического этанолата, так и в форме аморфной субстанции. В связи с этим существует потребность в разработке и совершенствовании методов количественного определения дарунавира. В качестве недорогой и эффективной альтернативы распространенным хроматографическим и титриметрическим методам может быть использовано спектрофотометрическое определение дарунавира в ультрафиолетовой области спектра (УФ-спектрофотометрия).

Цель. Разработать и валидировать методику количественного определения аморфного дарунавира в субстанции методом УФ-спектрофотометрии.

Материалы и методы. Для исследования использовали следующие субстанции и расходные материалы: субстанцию-порошок дарунавира аморфного (USP); стандартный образец дарунавира (MSN Pharmachem Pvt. Ltd., Индия); метанол, класс «ос.ч.», для градиентной ВЭЖХ 99,9%; ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ 99,9%; уксусная кислота (ледяная) для ВЭЖХ; 0,1 моль/л раствор хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте для титрования в неводных средах; нейлоновые шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм. Спектрофотометрическое определение дарунавира проводили, используя спектрофотометр Cary 60 (Agilent Technologies, США) и спектрофотометр UNICO 2800 (United Products & Instruments, Inc., США). Для изготовления стандартных растворов использовали весы аналитические Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Швейцария), весы аналитические GH-120 (AND, Япония), мерную посуду класса А, градуированные пипетки ISOLAB.

Результаты и обсуждение. Методика была разработана и валидирована по следующим характеристикам: специфичности, линейности, правильности, прецизионности, аналитической области. По результатам исследования основные валидационные характеристики метода соответствуют критериям приемлемости.

Заключение. Была проведена успешная разработка и валидация новой методики количественного определения аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии. Методика может быть использована для проведения контроля качества субстанций, действующим веществом которых является аморфный дарунавир, в том числе для внутриаптечного контроля.

Ключевые слова: аморфный дарунавир, УФ-спектрофотометрия, валидация, специфичность, линейность

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

Вклад авторов. М. А. Мандрик, И. А. Садковский, Е. Д. Пинегина – дизайн исследования, проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, написание и редактирование статьи. В рецензировании и одобрении результатов участвовали Л. А. Король и И. И. Краснюк Все соавторы участвовали в обсуждении результатов.

Для цитирования: Мандрик М. А., Садковский И. А., Пинегина Е. Д., Король Л. А., Краснюк И. И. Разработка и валидация методики количественного определения субстанции аморфного дарунавира методом УФ-спектрофотометрии. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2024;13(3):117–125. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1749>

Development and validation of UV-spectrophotometry method for quantitative determination of amorphous darunavir

Mark A. Mandrik^{1,2}✉, Ivan A. Sadkovskii^{1,2}, Elizaveta D. Pinegina¹,
Ludmila A. Korol¹, Ivan I. Krasnuk¹

¹ I. M. Sechenov First MSMU of the Ministry of Health of the Russian Federation (Sechenov University). 8/2, Trubetskaya str., Moscow, 119991, Russia

² A. V. Topchiev Institute of Petrochemical Synthesis, RAS (TIPS RAS). 29, Leninsky Prospekt, Moscow, 119991, Russia

✉ **Corresponding author:** Mark A. Mandrik. **E-mail:** mandrik_m_a@staff.sechenov.ru

ORCID: Mark A. Mandrik – <https://orcid.org/0000-0002-3558-9615>;
Ivan A. Sadkovskii – <https://orcid.org/0000-0001-8375-9909>;
Elizaveta D. Pinegina – <https://orcid.org/0009-0001-7890-0821>;
Ludmila A. Korol – <https://orcid.org/0000-0001-5919-1866>;
Ivan I. Krasnuk – <https://orcid.org/0000-0002-7242-2988>.

Received: 14.02.2024

Accepted: 05.08.2024

Published: 09.08.2024

Abstract

Introduction. Darunavir as an effective antiretroviral drug is widely used in clinical practice, including for the treatment of pediatric patients, as well as pregnant women, and for personalized therapy. Currently darunavir is used in the production of finished dosage forms, both in the form of crystalline ethanolate and in the form of an amorphous substance. In this regard, there is a need to develop and improve methods for the quantitative determination of darunavir. As an inexpensive and effective alternative to common chromatographic and titrimetric methods, spectrophotometric determination of darunavir in the ultraviolet region of the spectrum (UV spectrophotometry) may be used.

Aim. To develop and validate a method for the quantitative determination of amorphous darunavir in the substance by UV spectrophotometry.

Materials and methods. The following substances and consumables were used for the research: powdered amorphous darunavir substance (USP); darunavir reference standard (MSN Pharmachem Pvt. Ltd., India); methanol for HPLC Gradient Grade 99.9 % (High purity); acetonitrile for HPLC Gradient Grade 99.9 %; glacial acetic acid for HPLC; 0.1 M perchloric acid solution (in anhydrous acetic acid) for titration in non-aqueous media; nylon syringe filters with a pore diameter of 0.22 microns. Spectrophotometric determination of darunavir was carried out using an Cary 60 spectrophotometer (Agilent Technologies, USA) and a UNICO 2800 spectrophotometer (United Products & Instruments, Inc., USA). To prepare standard solutions, we used analytical balance Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Switzerland), analytical balance GH-120 (AND, Japan) class A measuring glassware, graduated pipettes ISOLAB.

Results and discussion. The method was developed and validated for the following characteristics: specificity, linearity, accuracy, precision, analytical range. According to the study results, the main validation characteristics of the method meet the acceptance criteria.

Conclusion. A new method for the quantitative determination of amorphous darunavir by UV spectrophotometry was successfully developed and validated. The method may be used to control the quality of substances of amorphous darunavir, including the intrapharmaceutical control.

Keywords: amorphous darunavir, UV spectrophotometry, validation, specificity, linearity

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. Mark A. Mandrik, Ivan A. Sadkovskii, Elizaveta D. Pinegina – research design, carrying out the experiments, statistical processing of results, manuscript writing and editing. Ludmila A. Korol and Ivan I. Krasnuk participated in the review and approval of the article. All authors participated in the discussion of the results.

For citation: Mandrik M. A., Sadkovskii I. A., Pinegina E. D., Korol L. A., Krasnuk I. I. Development and validation of UV-spectrophotometry method for quantitative determination of amorphous darunavir. *Drug development & registration.* 2024;13(3):117–125. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2024-13-3-1749>

ВВЕДЕНИЕ

Дарунавир ((3R,3aS,6aR)-гексагидрофуро[2,3-b]фуран-3-ил](N-((2S,3R)-4-[4-амино-N-(2-метилпропил)бензолсульфонамидо]-3-гидрокси-1-фенилбутан-2-ил}карбамат) – непептидное соединение из класса синтетических ингибиторов протеаз, широко применяемое в качестве средства антиретровирусной терапии пациентов с вирусом иммунодефицита человека первого типа (ВИЧ-1) [1]. Механизм действия дарунавира основан на ингибировании аспарагиновой протеазы ВИЧ-1, что препятствует расщеплению вирусных Gal-Pol-полипротеинов на функциональные фрагменты в инфицированных клетках, тем самым предотвращая образование зрелых вирусных частиц [2]. Дарунавир демонстрирует высокую эффективность в отношении ВИЧ дикого типа [3], а также является важным компонентом комбинированной антиретровирусной терапии, при которой назначается совместно с другими антиретровирусными препаратами [4], в том числе детям [5] и беременным женщинам [6]. Этому способствует ряд его особенностей, таких как уникально высокая прочность связывания с активным центром вирусной протеазы и длительное время диссоциации образовавшегося комплекса [7]. Кроме того, благодаря гибкой структуре молекулы дарунавир демонстрирует широкую специфичность в отношении мутировавших и высокорезистентных протеаз, вследствие чего остается эффективным против штаммов ВИЧ, устойчивых к другим препаратам этого класса [8]. При этом возникает вариабельность эффективных терапевтических концентраций среди различных категорий пациентов: так, для ранее не получавших терапию целевые значения концентрации дарунавира в плазме крови в 10 раз меньше, чем для ранее получавших, что делает его перспективным инструментом персонализированной терапии ВИЧ-инфекции [9].

Одной из характерных особенностей дарунавира является псевдополиморфное поведение (сольватоморфизм) – способность образовывать молекулярные комплексы (сольваты), содержащие в кристаллической решетке как молекулы самого вещества, так и молекулы различных растворителей [10, 11] и обладающие различными физико-химическими свойствами. В качестве активной фармацевтической субстанции (АФС) в первом зарегистрированном препарате дарунавира использовался дарунавир этанолат, однако в настоящее время наряду с кристаллическим этанолатом в фармацевтическом производстве используется и несольватированная аморфная форма дарунавира, обладающая лучшей растворимостью [10].

В связи с широким использованием обеих форм дарунавира в фармацевтическом производстве, а также перспективностью его применения для изготовления персонализированных лекарственных форм аптечными организациями высокую актуальность приобретает разработка простых, дешевых и

быстрых аналитических методов количественного определения этого вещества в целях контроля качества как субстанции, так и готовых лекарственных форм.

В настоящее время основным методом количественного определения дарунавира как в субстанции, так и в готовых лекарственных формах является высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). В частности, метод ВЭЖХ предлагается для количественного определения дарунавира и дарунавира этанолата Государственной фармакопеей XV издания. Подробно некоторые методики хроматографического определения дарунавира описаны в исследовательских работах [12–14], а также в соответствующих фармакопейных статьях^{1, 2}. И хотя метод характеризуется очевидными достоинствами, такими как точность и высокая чувствительность, а также возможностью его использования для оценки стабильности лекарственных препаратов [15] или контроля содержания примесей [16], высокая стоимость оборудования и реактивов является существенным недостатком ВЭЖХ, ограничивающим ее повсеместное применение [17].

Альтернативным фармакопейным методом количественного определения дарунавира является потенциометрическое титрование в среде безводной уксусной кислоты. Метод является абсолютным, однако обладает рядом недостатков: низкой чувствительностью и специфичностью.

Прочие известные методы включают в себя определение дарунавира этанолата в таблетках посредством инфракрасной спектроскопии [18], капиллярного электрофореза [19] и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) [20], а также УФ-спектрофотометрии.

Спектрофотометрия может рассматриваться в качестве альтернативного метода, обладающего относительно высокой чувствительностью и не требующего значительных затрат времени, а также использования дорогого оборудования и реагентов. В научной литературе описаны разработка и валидация ряда методик, подразумевающих прямое спектрофотометрическое определение дарунавира этанолата с использованием метанола [21] или 0,1 М раствора HCl [22] в качестве среды растворения, а также методик, основанных на дериватизации этанолата дарунавира с последующим колориметрическим определением [23–25]. Однако описания валидированной методики УФ-спектрофотометрического определения дарунавира в тех случаях, когда субстанция является не кристаллическим этанолатом, а аморфным порошком, обнаружено не было, что

¹ ФС.2.1.0402. «Дарунавир». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/darunavir/> Ссылка активна на 14.02.2024.

² ФС.2.1.0403. «Дарунавир этанолат». Доступно по: <https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/2/2-1/darunavira-etanolat/> Ссылка активна на 14.02.2024.

делает разработку и валидацию такой методики актуальной задачей.

Таким образом, **целью данного исследования** является разработка и валидация методики количественного определения аморфного дарунавир в субстанции методом УФ-спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и расходные материалы

В качестве исследуемого соединения были взяты субстанция-порошок дарунавир аморфного (USP) и стандартный образец дарунавир производства MSN Pharmachem Pvt. Ltd. (Индия). Также для проведения исследования были использованы: метанол «ос.ч.» для градиентной ВЭЖХ 99,9%; ацетонитрил для градиентной ВЭЖХ 99,9%; уксусная кислота (ледяная) для ВЭЖХ; 0,1 моль/л раствор хлорной кислоты в безводной уксусной кислоте для титрования в неводных средах; нейлоновые шприцевые фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Приборы и оборудование

Спектрофотометр Cary 60 (Agilent Technologies, США), спектрофотометр UNICO 2800 (United Products & Instruments, Inc., США), титратор Compact G10S (METTLER TOLEDO, Швейцария); весы аналитические Analytical Balance MS105/A (METTLER TOLEDO, Швейцария), весы аналитические GH-120 (AND, Япония), мерная посуда класса А, градуированные пипетки ISOLAB.

Приготовление стандартных растворов

Для приготовления исходных стандартных растворов около 50 мг дарунавир (точная навеска) растворяли в мерной колбе вместимостью 100 мл, используя метанол в качестве среды растворения. Содержимое колбы перемешивали до полного растворения навески, объем раствора доводили метанолом. Концентрация полученного раствора составила 0,5 мг/мл (раствор А). 2,0 мл полученного раствора помещали в мерную колбу объемом 50 мл, объем раствора доводили до метки метанолом, плотно закупоривали, перемешивали. Концентрация полученного раствора составила 20 мкг/мл (раствор Б).

Стандартные растворы готовили путем разведения растворов А и Б (таблица 1). Необходимый объем отбирали с помощью градуированных стеклянных пипеток.

Каждую отобранную пробу перед измерением профильтровывали через нейлоновый шприцевой фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Оптическую плотность образцов стандартных растворов измеряли на спектрофотометре в кварцевой кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 268 нм, используя в качестве раствора сравнения чистый метанол.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методика была валидирована в соответствии с ОФС.1.1.0012 «Валидация аналитических методик» ГФ XV по следующим характеристикам: специфичности, линейности, правильности, прецизионности (на двух уровнях: сходимости, межлабораторная прецизионность), аналитической области. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС 1.1.0013. «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» ГФ XV.

Таблица 1. Стандартные растворы аморфного дарунавир

Table 1. Standard solutions of amorphous darunavir

Концентрация раствора аморфного дарунавир, мкг/мл Concentration of amorphous darunavir solution, mcg/ml	Количество компонента, мл Amount of component, ml	
	Исходный стандартный раствор аморфного дарунавир Stock solution of amorphous darunavir	Метанол Methanol
2	1 мл (раствор Б) 1 ml (solution B)	до 10 up to 10
4	5 мл (раствор Б) 5 ml (solution B)	до 25 up to 25
6,4	8 мл (раствор Б) 8 ml (solution B)	до 25 up to 25
8	4 мл (раствор Б) 4 ml (solution B)	до 10 up to 10
10	5 мл (раствор Б) 5 ml (solution B)	до 10 up to 10
13	6,5 мл (раствор Б) 6.5 ml (solution B)	до 10 up to 10
15	7,5 мл (раствор Б) 7.5 ml (solution B)	до 10 up to 10
18	9 мл (раствор Б) 9 ml (solution B)	до 10 up to 10
20	10 мл (раствор Б исходный) 10 ml (solution B initial)	не добавляли not added
22	1,1 мл (раствор А) 1.1 ml (solution A)	до 25 up to 25
25	2,5 мл (раствор А) 2.5 ml (solution A)	до 50 up to 50

Ранее в работе [26] было показано, что дарунавир стабилен при повышенной температуре, не подвержен окислению в среде пероксида водорода 3 и 6 %, устойчив к воздействию ультрафиолета. При этом в случае кислотного и щелочного гидролиза дарунавир разлагается с образованием различных продуктов деструкции.

Поэтому **специфичность** метода была доказана по совпадению максимумов – (268 ± 2,0 нм) – спектров испытуемого раствора и стандартного раство-

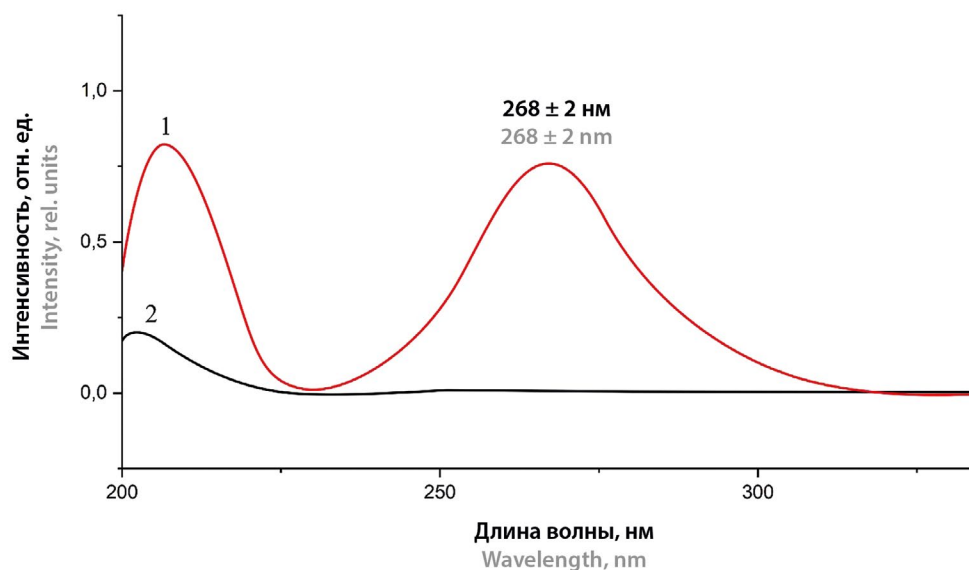


Рисунок 1. УФ-спектры:

1 – стандартный образец дарунавира (20 мкг/мл), 2 – метанол

Figure 1. UV spectra:

1 – darunavir standard sample (20 mcg/ml), 2 – methanol

ра, отсутствию влияния растворителя на результаты спектрофотометрического анализа (рисунок 1), а также путем сравнения результатов испытаний проб, подвергнутых кислотному и щелочному гидролизу, с результатами фармакопейной методики – потенциометрического титрования. Разложение осуществляли в соответствии с методикой, ранее описанной в работе [27], за тем исключением, что как в случае кислотного, так и в случае щелочного гидролиза процесс разложения занимал 48 часов. Титрование проводили в соответствии с ФС.2.1.0402 «Дарунавир» и ОФС.1.2.1.19.0002.15 «Потенциометрическое титрование».

Результаты количественного определения методами титрования и УФ-спектрофотометрии образцов аморфного дарунавира, подвергнутых кислотному и щелочному гидролизу, представлены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Сравнение метрологических характеристик использованных методов представлено в таблицах 4 и 5 соответственно.

Для сравнения двух методов количественного определения аморфного дарунавира – потенциометрического титрования и УФ-спектрофотометрии – на равнозначность использовали критерий Фишера. Значения F_1 и F_2 для выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого кислотному и щелочному гидролизу, составили 0,62 и 0,6 соответственно, что в обоих случаях меньше табличного F (99 %, 4,4) = 15,98. Статически достоверное различие величин дисперсий отсутствует. Выборки в обоих случаях равнозначны.

Таблица 2. Количественное определение образцов дарунавира, подвергнутого кислотному гидролизу

Table 2. Quantitative determination of darunavir samples exposed to acid hydrolysis

Взято, г Taken, g	Найдено, г Found value, g	Найдено, % Found value, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration			
0,3015	0,2586	85,77	$\bar{x} = 86,31 \%$ $S = 0,93$ $S\bar{x} = 0,41$ $\Delta\bar{x} = 1,15$ $\Delta x = 2,57$ $RSD = 1,07 \%$ $\bar{\epsilon} = 1,33 \%$ $S^2 = 0,86$
0,3008	0,2561	85,14	
0,3011	0,2597	86,25	
0,3014	0,2638	87,52	
0,3007	0,2612	86,86	
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry			
0,301	0,2598	86,31	$\bar{x} = 86,43 \%$ $S = 0,73$ $S\bar{x} = 0,33$ $\Delta\bar{x} = 0,91$ $\Delta x = 2,04$ $RSD = 0,85 \%$ $\bar{\epsilon} = 1,05 \%$ $S^2 = 0,54$
0,3008	0,2604	86,57	
0,3013	0,2582	85,69	
0,3004	0,2583	85,99	
0,3009	0,2636	87,60	

Таблица 3. Количественное определение образцов дарунавира, подвергнутого щелочному гидролизу

Table 3. Quantitative determination of darunavir samples exposed to base hydrolysis

Взято, г Taken, g	Найдено, г Found value, g	Найдено, % Found value, %	Метрологические характеристики Metrological characteristics
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration			
0,3009	0,2355	78,27	$\bar{x} = 78,93 \%$ $S = 0,98$ $S\bar{x} = 0,44$ $\Delta\bar{x} = 1,21$ $\Delta x = 2,71$ $RSD = 1,24 \%$ $\bar{\epsilon} = 1,54 \%$ $S^2 = 0,95$
0,3012	0,2336	77,56	
0,3011	0,2399	79,67	
0,3002	0,2396	79,81	
0,301	0,2388	79,34	
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry			
0,3012	0,2377	78,92	$\bar{x} = 78,57 \%$ $S = 0,75$ $S\bar{x} = 0,34$ $\Delta\bar{x} = 0,94$ $\Delta x = 2,09$ $RSD = 0,96 \%$ $\bar{\epsilon} = 1,19 \%$ $S^2 = 0,57$
0,3008	0,2351	78,16	
0,3011	0,2389	79,34	
0,3004	0,2327	77,46	
0,3006	0,2374	78,96	

Сравнение средних указанных выборок осуществляли путем вычисления средневзвешенных $S_1 = 0,529$ и $S_2 = 0,574$ для вычисления критерия Стьюдента, ко-

торый составил 0,23 и 0,63 соответственно. Расчетные значения критерия Стьюдента в обоих случаях меньше табличного $t(P = 0,95; 8) = 2,31$, расхождение между средними результатами незначимо.

Линейность методики исследовали, измеряя оптическую плотность 11 образцов стандартных растворов с концентрациями 2, 4, 6,4, 8, 10, 13, 15, 18, 20, 22, 25 мкг/мл, то есть в диапазоне от 10 до 125 % от концентрации дарунавира, принятой за 100 % (20 мкг/мл). По полученным результатам построен калибровочный график (рисунок 2). Коэффициент корреляции составил 0,9996 (более 0,9950) при $y = 0,0385x - 0,0027$, где y – оптическая плотность; x – концентрация (мкг/мл).

Правильность методики была подтверждена результатами анализа стандартных растворов в концентрации 10, 65, 125 % от номинальной. Результаты оценки правильности представлены в таблице 6. Крайние значения результатов отдельных определений (97,79 и 102,34 %) и среднего результата (100,26 %) при $P = 95 \%$ лежат внутри доверительных интервалов результатов отдельного определения $100 \pm 2,98 \%$ и среднего результата $100 \pm 0,77 \%$ соответственно. Относительное стандартное отклонение среднего результата определения (коэффициент вариации) не превышает 2,00 %; относительная погрешность среднего результата – менее 2,00 %.

С целью определения **сходимости методики** количественного определения аморфного дарунавира было приготовлено и проанализировано по 5 образцов каждого из 3 стандартных растворов с концентрацией 2, 13, 25 мкг/мл (10, 32 и 125 % от номинального значения соответственно). Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 4. Данные для статистической обработки средних результатов выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого кислотному гидролизу

Table 4. Data for statistical processing of sample mean obtained as a result of quantitative determination of darunavir samples exposed to acid hydrolysis

Метод Method	n	f	$\bar{x}, \%$	S	$S\bar{x}$	$P_2, \%$	$t(P_2, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration	5	4	86,31	0,93	0,41	95	2,78	2,57	1,15	1,33
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry	5	4	86,43	0,73	0,33	95	2,78	2,04	0,91	1,05

Таблица 5. Данные для статистической обработки средних результатов выборок, полученных в результате количественного определения образцов дарунавира, подвергнутого щелочному гидролизу

Table 5. Data for statistical processing of sample mean obtained as a result of quantitative determination of darunavir samples exposed to base hydrolysis

Метод Method	n	f	$\bar{x}, \%$	S	$S\bar{x}$	$P_2, \%$	$t(P_2, f)$	Δx	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$
Потенциометрическое титрование Potentiometric titration	5	4	78,93	0,98	0,44	95	2,78	2,71	1,21	1,54
УФ-спектрофотометрия UV spectrophotometry	5	4	78,57	0,75	0,34	95	2,78	2,09	0,94	1,19

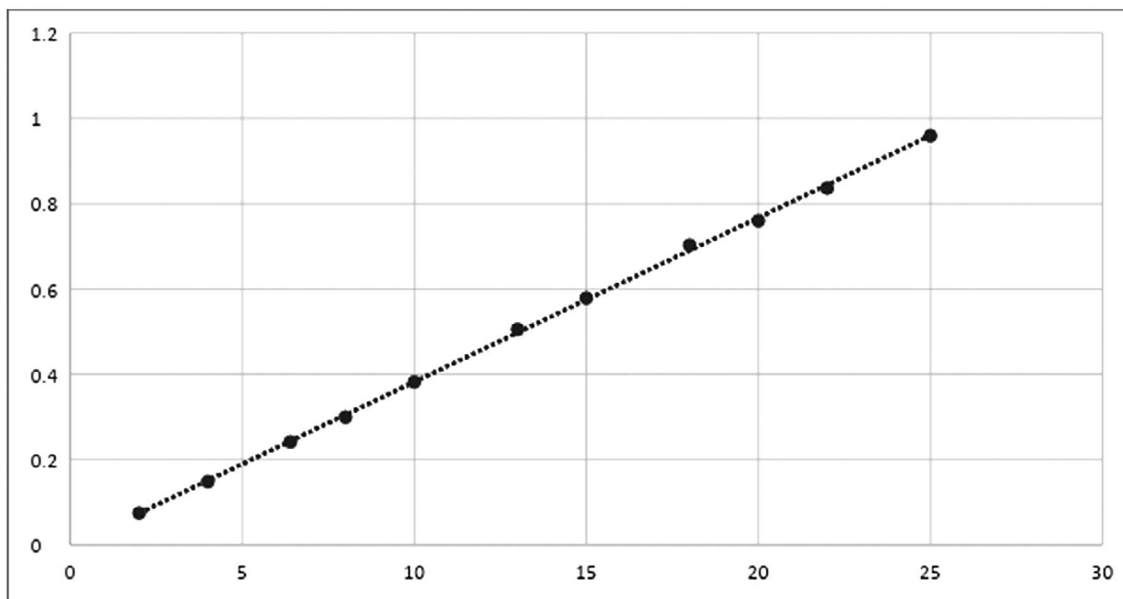


Рисунок 2. Калибровочный график зависимости оптической плотности раствора от концентрации аморфного дарунавира

Figure 2. Graph of linear dependence of optical density (D) of the solution on concentration (C) of amorphous darunavir

Таблица 6. Оценка правильности и сходимости методики

Table 6. Estimation of accuracy and repeatability

$C_{\text{факт.}}$, мкг/мл $C_{\text{факт.}}$, mcg/ml	$C_{\text{рассчит.}}$, мкг/мл $C_{\text{calculated}}$, mcg/ml	Абсолютная погрешность $\Delta X = C_{\text{рассчит.}} - C_{\text{факт.}}$ Absolute error $\Delta X = C_{\text{calculated}} - C_{\text{fact}}$	Относительная погрешность $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{факт.}} $ Relative error $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{fact}} $	Найдено, % Value, %	Метрологические характеристики ($P = 95\%$, $n = 15$) Metrological characteristics ($P = 95\%$, $n = 15$)
2	1,961	-0,039	-1,948	101,95	$\bar{x} = 100,26\%$ $S = 1,39$ $S\bar{x} = 0,36$ $\Delta\bar{x} = 0,77$ $\Delta x = 2,99$ $RSD = 1,39\%$ $\bar{\epsilon} = 0,77\%$ $S^2 = 1,93$
	2,023	0,023	1,169	98,83	
	1,953	-0,047	-2,338	102,34	
	2,044	0,044	2,208	97,79	
	2,039	0,039	1,948	98,05	
13	12,756	-0,244	-1,878	101,88	
	12,805	-0,195	-1,499	101,50	
	12,829	-0,171	-1,319	101,32	
	12,914	-0,086	-0,659	100,66	
	12,927	-0,073	-0,559	100,56	
25	25,000	0,000	0,000	100,00	
	25,042	0,042	0,166	99,83	
	25,023	0,023	0,094	99,91	
	25,049	0,049	0,197	99,80	
	25,148	0,148	0,592	99,41	

Таблица 7. Оценка сходимости и межлабораторной прецизионности методики

Table 7. Estimation of the repeatability and interlaboratory precision

$C_{\text{факт.}}$, мкг/мл C_{fact} , mcg/ml	$C_{\text{рассчит.}}$, мкг/мл $C_{\text{calculated}}$, mcg/ml	Абсолютная погрешность $\Delta X = C_{\text{рассчит.}} - C_{\text{факт.}}$ Absolute error $\Delta X = C_{\text{calculated}} - C_{\text{fact}}$	Относительная погрешность $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{факт.}} $ Relative error $\delta = \Delta X \cdot 100 / C_{\text{fact}} $	Найдено, % Value, %	Метрологические характеристики ($P = 95 \%$, $n = 15$) Metrological characteristics ($P = 95 \%$, $n = 15$)
2	1,984	-0,016	-0,779	100,78	$\bar{x} = 100,05 \%$ $S = 1,17$ $S\bar{x} = 0,3$ $\Delta\bar{x} = 0,65$ $\Delta x = 2,51$ $RSD = 1,17 \%$ $\varepsilon = 0,65 \%$ $S^2 = 1,37$
	1,964	-0,036	-1,818	101,89	
	2,029	0,029	1,429	98,57	
	1,995	-0,005	-0,260	100,26	
	1,961	-0,039	-1,948	101,95	
13	13,047	0,047	0,360	99,64	
	13,244	0,244	1,878	98,12	
	12,984	-0,016	-0,120	100,12	
	13,174	0,174	1,339	98,66	
	13,156	0,156	1,199	98,80	
25	24,745	-0,255	-1,018	101,02	
	25,145	0,145	0,582	99,42	
	24,847	-0,153	-0,613	100,61	
	24,855	-0,145	-0,582	100,58	
	24,935	-0,065	-0,260	100,26	

Для оценки **межлабораторной прецизионности** было проведено полное повторение экспериментов по определению сходимости методики вторым аналитиком в другой лаборатории. Статический анализ результатов определения сходимости методики и межлабораторной прецизионности для разных лабораторий приведен в таблицах 6 и 7 соответственно. Межлабораторная прецизионность подтверждена: относительная погрешность среднего результата $\bar{\varepsilon}$ – менее 2,00 %, коэффициент вариации составил менее 1,2 %.

Диапазон концентраций, в котором сохраняется линейная зависимость, а также доказана приемлемая правильность и прецизионность методики, составил от 2 мкг/мл до 25 мкг/мл (10 и 125 % от номинального значения соответственно) и может рассматриваться как **аналитическая область методики**.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Была разработана методика количественного определения аморфного дарунавиром методом УФ-спектрофотометрии, имеющая практическую значимость. При помощи валидационной оценки установлено, что методика является специфичной, линейной в аналитической области, правильной и прецизионной.

Методика может быть использована в качестве альтернативы фармакопейным методам для количественного определения аморфного дарунавиром при проведении контроля качества субстанции, что особенно актуально для производственных аптек при проведении входного контроля. Также методика мо-

жет служить основой для разработки методик количественного экспресс-анализа дарунавиром в экстремальных лекарственных препаратах.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- McKeage K., Perry C.M., Keam S.J. Darunavir: a review of its use in the management of HIV infection in adults. *Drugs*. 2009;69:477–503. DOI: 10.2165/00003495-200969040-00007.
- Wang Y., Lv Z., Chu Y. HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*. 2015;7:95–104. DOI: 10.2147/hiv.s79956.
- Lascar R., Benn P. Role of darunavir in the management of HIV infection. *HIV/AIDS – Research and Palliative Care*. 2009;1:31–39. DOI: 10.2147/hiv.s5397.
- Saag M.S., Gandhi R.T., Hoy J.F., Landovitz R.J., Thompson M.A., Sax P.E., Smith D.M., Benson C.A., Buchbinder S.P., del Rio C., Eron J.J. Jr., Fätkenheuer G., Günthard H.F., Molina J.-M., Jacobsen D.M., Volberding P.A. Antiretroviral Drugs for Treatment and Prevention of HIV Infection in Adults. 2020 Recommendations of the International Antiviral Society-USA Panel. *JAMA*. 2020;324(16):1651–1669. DOI: 10.1001/jama.2020.17025.
- Keating G.M. Darunavir: A Review in Pediatric HIV-1 Infection. *Paediatr Drugs*. 2015;17(5):411–421. DOI: 10.1007/s40272-015-0146-0.
- Pope R. Jr., Kashuba A. Darunavir for use in pregnant women with HIV. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2017; 10(12):1317–1327. DOI: 10.1080/17512433.2017.1390428.
- King N.M., Prabu-Jeyabalan M., Nalivaika E.A., Wigerinck P., de Béthune M.-P., Schiffer C.A. Structural and thermodynamic basis for the binding of TMC114, a next-generation human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor. *Journal of Virology*. 2004;78(21):12012–12021. DOI: 10.1128/jvi.78.21.12012-12021.2004.

8. Tremblay C.L. Combating HIV resistance – focus on darunavir. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2008;4(4):759–765. DOI: 10.2147/tcrm.s1709.
9. Cusato J., Allegra S., de Nicolò A., Calcagno A., D'Avolio A. Precision medicine for HIV: where are we? *Pharmacogenomics*. 2018;19(2):145–165. DOI: 10.2217/pgs-2017-0123.
10. Zolotov S.A., Dain I.A., Demina N.B., Zolotova A.S., Ponomarev E.S. The Effect of Solvents and Drying Temperature on the Physicochemical Properties of Darunavir and Darunavir Ethanolate Substances. *Drug development & registration*. 2021;10(1):67–73. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-67-73.
11. Van Gyseghem E., Stokbroekx S., de Armas H.N., Dickens J., Vanstockem M., Baert L., Rosier J., Schueller L., Van den Mooter G. Solid state characterization of the anti-HIV drug TMC114: interconversion of amorphous TMC114, TMC114 ethanolate and hydrate. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2009;38(5):489–497. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.09.013.
12. Kavitha A.N., Raman D., Janaki R.K. A New Validated RP-HPLC Method for the Estimation of Darunavir Ethanolate in Bulk and Tablets. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP)*. 2020;14(4):652–660.
13. Paul K., Jaswanth Gowda B.H., Shankar, S.J., Reddy D.N. Development and validation of simplified RP-HPLC method for quantification of Darunavir in commercial tablets. *Materials Today: Proceedings*. 2021;47(14):4155–4161. DOI: 10.1016/j.matpr.2021.04.444.
14. Rao K.P., Ramesh B.V., Prasad C.S., Ramana G.V., Rao M.C. Validated isocratic reversed phase liquid chromatographic method for the determination of darunavir in pure and formulations. *Der Pharmacia Lettre*. 2016;8(10):222–228.
15. Reddy B.V.R., Jyothi G., Reddy B.S., Raman N.V.V.S.S., Reddy K.S.C., Rambabu C. Stability-indicating HPLC method for the determination of darunavir ethanolate. *Journal of Chromatographic Science*. 2013;51(5):471–476. DOI: 10.1093/chromsci/bms165.
16. Mantena B.P.V., Rao S.V., Appa Rao K.M.C., Ramakrishna K., Reddy R.S. Method development and validation for the determination of four potential impurities present in darunavir tablets by reverse phase-ultra-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2015;38(12):1236–1246. DOI: 10.1080/10826076.2015.1037449.
17. Timchenko Yu.V. Advantages and disadvantages of high-performance liquid chromatography (HPCL). *Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2021;8(10):335.
18. Kogawa A.C., Salgado H.R.N. Development and validation of infrared spectroscopy method for the determination of darunavir in tablets. *Physical Chemistry*. 2013;3(1):1–6. DOI: 10.5923/j.pc.20130301.01.
19. Kogawa A.C., Aguiar F.A., Gaitani C.M., Salgado H.R.N. Validation of a stability indicating capillary electrophoresis method for the determination of darunavir in tablets and comparison with the of infrared absorption spectroscopic method. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;3:283–297.
20. Patel B., Suhagia B., Patel C., Panchal H. A simple and sensitive HPTLC method for quantitative analysis of darunavir ethanolate tablets. *Journal of Planar Chromatography – Modern TLC*. 2011;24(3):232–235. DOI: 10.1556/jpc.24.2011.3.11.
21. Ghante M., Shelar R.S., Sawant S., Kadam M.M. Development and validation of UV spectrophotometric method for estimation of darunavir ethanolate in bulk and tablet dosage form. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2014;6(7):240–242.
22. Singh V.D., Singh V.K. Chemo-metric assisted UV-spectrophotometric methods for simultaneous estimation of Darunavir ethanolate and Cobicistat in binary mixture and their tablet formulation. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2021;250:119383. DOI: 10.1016/j.saa.2020.119383.
23. Rao P.K. Validation of Visible Spectrophotometric Methods of Darunavir in Pure and Dosage Forms. *Der Pharma Chemica*. 2016;8(17):54–61.
24. Rajendran V., Ramya Y.N.S., Mani A.D., Dhanaraju M.D. Spectrophotometric determination of darunavir ethanolate by condensation technique. *International Journal of PharmTech Research*. 2016;9(6):301–306.
25. Krishna Kumar Rao K.V.V., Phanindra B., Rajesh K. Spectrophotometric method for estimation of darunavir ethanolate by using MBTH reagent in bulk and pharmaceutical dosage form. *Inventi Rapid*. 2013;4:1–3.
26. Nageswara Rao R., Ramachandra B., Sravan B., Khalid S. LC-MS/MS structural characterization of stress degradation products including the development of a stability indicating assay of Darunavir: An anti-HIV drug. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2014;89:28–33. DOI: 10.1016/j.jpba.2013.10.007.
27. Modini A.K., Ranga M., Puppala U., Kaliyapermal M., Geeredy M.K.R., Samineni R., Grover P., Konidala S.K. Identification, Isolation, and Structural Characterization of Novel Forced Degradation Products of Darunavir Using Advanced Analytical Techniques Like UPLC-MS, Prep-HPLC, HRMS, NMR, and FT-IR Spectroscopy. *Chromatographia*. 2023;86(1):63–78. DOI: 10.1007/s10337-022-04226-z.