

Development and Validation of New Methods for Quality Control of the Antiviral Substance FAVIPIRAVIR

Yu.V. Scrypynets[†], G.O. Fedosenko[‡], G.V. Maltsev[‡], I.I. Chebotarska[†], D.I. Aleksandrova[†], S.N. Kashutskyy[‡], A.V. Yegorova^{**†}

[†] A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine, Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine; *e-mail: yegorovalla@gmail.com

[‡] "INTERCHEM", Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine;

Received: November 27, 2022; Accepted: June 12, 2023

DOI: 10.17721/moca.2023.70-80

The introduction into the production of medicinal substances involves the creation of a pharmaceutical dossier, an important component of which is data on pharmaceutical development and quality control methods. The physico-chemical properties of the antiviral substance of favipiravir were investigated, and some basic sections of the analytical documentation were developed. With the help of a complex of physical, chemical, and physico-chemical methods of analysis, the "Identification" test was developed, and the structure of favipiravir was proven. Methods for the determination of related substances by the HPLC with UV detection and the assay of favipiravir by the acid-base titration method, suitable for substance quality control, have been developed. Relative retention times and correction factors for calculating their content are established for all impurities. The methods were validated on the parameters of specificity, accuracy, correctness, and linearity in the studied range of concentrations.

Keywords: high-performance liquid chromatography, spectroscopy, mass spectrometry, acid-base titration, favipiravir

Розробка та валідація нових методик контролю якості субстанції протівірусної дії ФАВІПІРАВІР**

Ю.В. Скрипинець[†], Г.О. Федосенко[‡], Г.В. Мальцев[‡], І.І. Чеботарська[†], Д.І. Александрова[†], С.М. Кашуцький[‡], А.В. Єгорова^{**†}

[†] Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України, Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна; *e-mail: yegorovalla@gmail.com

[‡] ТДВ «ІНТЕРХІМ», Люстдорфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна;

Надійшла: 27 лютого 2022 р.; Прийнята: 12 червня 2023 р

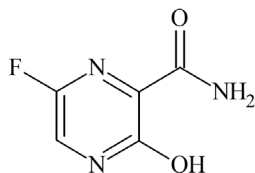
DOI: 10.17721/moca.2023.70-80

**За матеріалами "Київської конференції з аналітичної хімії: Сучасні тенденції 2022".

Впровадження у виробництво лікарських субстанцій передбачає створення фармацевтичного дос'є, важливою складовою якого є дані фармацевтичної розробки та методики контролю якості. Було досліджено фізико-хімічні властивості субстанції протівірусної дії фавіпіравіру та розроблено деякі принципові розділи аналітичної документації. За допомогою комплексу фізичних, хімічних та фізико-хімічних методів аналізу розроблено тест «Ідентифікація» та доведено будову фавіпіравіру. Розроблено методики визначення супровідних домішок методом ВЕРХ з УФ- детектуванням та кількісного визначення основної речовини фавіпіравіру методом кислотно-основного титрування, придатні для контролю якості субстанції. Для усіх домішок встановлено відносні часи утримування та поправкові коефіцієнти для розрахунку їх вмісту. Методики валідовано за показниками специфічність, точність, правильність, лінійність у вивченому діапазоні концентрацій.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія, спектроскопія, мас-спектрометрія, кислотно-основне титрування, фавіпіравір

У грудні 2019 року в Ухані (Китай) поширився новий вірус SARS-CoV-2. Оскільки масштаби спалаху COVID-19 досягли масштабів пандемії, з'явився значний інтерес для використання протівірусних агентів проти COVID-19 [1]. Фавіпіравір (ФАВ) – пероральний протівірусний препарат, схвалений для лікування грипу в Японії.



3-гідрокси-6-флуоропіразин-2-карбоксамід
(ФАВІПІРАВІР, ФАВ)

Цей препарат – аналог пуринового нуклеозиду, який вибірково пригнічує РНК-полімеразу, що бере участь у реплікації вірусу грипу, демонструє протівірусну активність [2]. Виробництво субстанції фавіпіравіру – актуальне завдання.

Відповідно до правил належної виробничої практики при створенні аналітичної документації на нову нефармакопейну субстанцію, встановлюють її структуру, вивчають фізико-хімічні характеристики, профіль супровідних домішок, кількісний вміст основної речовини. Для цього необхідна розробка нових аналітичних методик контролю якості та їх валідація.

Для кількісного визначення ФАВ у фармацевтичних препаратах використовують ВЕРХ [3–5]. Розроблено високочутливі методики хроматографічного, люмінесцентного та спектрофотометричного визначення залишків ФАВ в змивах при очищенні фармацевтичного обладнання [6]. Оптимізовано хроматографічні умови та умови реєстрації власної люмінесценції фавіпіравіру.

У статті Державної Фармакопеї України [7] наведено методику ВЕРХ-визначення фавіпіравіру, яка потребує стандартного зразка, значної витрати розчинників та тривалого часу проведення аналізу. Тому розробка та валідація титриметричних методик кількісного визначення активної речовини в субстанціях, що дозволяють отримувати найбільш точний результат, продовжують залишатися актуальними. Також у фармакопейній статті відсутній такий важливий при стандартизації АФІ показник якості, як «Супровідні домішки».

Метою даної роботи було дослідження фізико-хімічних властивостей фавіпіравіру, розробка та валідація нових методик для деяких принципових розділів аналітичної документації на цю субстанцію.

Матеріали та методи дослідження

Визначення виконували відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [8].

Дослідження проводили на зразках субстанції ФАВ: серія WD-A002-200402 (Cangzhou Wisdom

Pharma Co., Ltd, Китай), серія FIR0641120 (Honour Lab Ltd, Індія) – білий кристалічний порошок; легко розчинний у диметилформаміді, помірно розчинний у ацетонітрилі, мало розчинний у воді.

У роботі використовували ваги лабораторні електронні AUX220 (SHIMADZU, Японія) і магнітну мішалку ARE (VELP Scientifica, Італія).

Воду для хроматографії отримували з використанням системи очищення води arium® pro UV фірми Sartorius.

pH розчинів вимірювали за допомогою pH-метра серії Seven Easy фірми Mettler Toledo.

Температури плавлення визначали за допомогою приладу для визначення температури плавлення серії MPM-H2 фірми Schorpp Gerätetechnik.

ІЧ-спектри отримані за допомогою приставки повного порушеного внутрішнього відображення Specac «Quartz» на спектрометрі FT-IR-8400S «Shimadzu» в діапазоні 4000 – 400 см⁻¹.

Сpektри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC (Shimadzu) спектральний діапазон вимірювань від 190 нм до 900 нм, точність: ± 0.003 А (поглинання), відтворюваність: ± 0.001 А.

Диференціальна скануюча калориметрія. Калориметр DSC Q2000, «TA Instruments». Зразок зважують на алюмінієвій чаші для аналізу, закривають кришкою під пресом та поміщають в комірку автосамплера. Нагрівання проводять в діапазоні 20 – 210 °С, зі швидкістю 5 °С/хв.

Лазерна дифрактометрія. Дифрактометр Mastersizer 3000, «Malvern». Сухий зразок вносять в диспергатор малого об'єму, диспергант – гексан, швидкість диспергатора 2000 – 2500 об/хв, час експерименту 10 сек, ослаблення лазеру 4 – 20 %.

Хроматомас-спектрометрія. Дослідження проводились на комбінованій системі ВЕРХ-МС: рідинний хроматограф 1260 Infinity та детектор 6530 Accurate Mass Q-TOF, «Agilent Technologies».

Розчин субстанції в ацетонітрилі (концентрація фавіпіравіру становить 1.0 мг/мл) хроматографували за таких умов: колонка з нержавіючої сталі розміром 10 см × 4.6 мм, заповнена силікагелем окта-децилсилільним для хроматографії з розміром частинок 3.5 мкм; рухома фаза – ацетонітрил – трифтороцтова кислота, 0.5% водний розчин (30:70); швидкість елювання – 0.5 мл/хв; температура колонки – 30 °С; об'єм інжекції – 1 мкл; тривалість аналізу – 30 хв; детектування – за загальним іонним струмом (TIC); спосіб іонізації – подвійний електроспрей при атмосферному тиску, в позитивному електричному полі; температура газу носія 300 °С; енергія фрагментатора – 150 Вт; небулайзер 45 psig; напруга на капілярі – 4500 В.

Розчин амінометилалізариндіоцтової кислоти. 96.4 мг амінометилалізариндіоцтової кислоти поміщають у мірну колбу місткістю 500.0 мл, для розчинення змочують наважку 0.2 мл 4% розчину

натрію гідроксиду, додають 250 мл води Р та 125 мг натрію ацетату, перемішують до розчинення реагенту. Далі додають краплями 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти до рН 4.5 і доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують.

Ацетатний буферний розчин. 52.5 г натрію ацетату розчиняють у 150 мл води, додають 25 мл кислоти оцтової льодяної та доводять водою до 250.0 мл. Якщо необхідно, доводять рН розчину до 4.5.

Розчин церію нітрату. 108,0 мг церію нітрату поміщають у мірну колбу місткістю 500.0 мл, додають 300 мл води та 1.0 мл 1 М розчину нітратної кислоти, перемішують 10 хв на магнітній мішалці, доводять об'єм розчину водою до позначки та перемішують.

Хроматограми в тесті «Супровідні домішки» рестрували на рідинному хроматографі 1260 Infinity з УФ-детектором (Agilent Technologies, США).

Методика

Розчинник – ацетонітрил : вода для хроматографії (50:50).

Випробовуваний розчин. 20.0 мг суб-станції поміщають у мірну колбу місткістю 20.0 мл, додають 10 мл розчинника, перемішують на магнітній мішалці протягом 30 хв, доводять об'єм розчину до позначки тим самим розчинником та перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь мембранний фільтр (0.20 мкм; RC)

Розчин порівняння. 1.0 мл випробовуваного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл, доводять об'єм розчину до позначки розчинником та перемішують.

5.0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 50.0 мл, доводять об'єм розчину до позначки розчинником та перемішують. Одержаний розчин фільтрують крізь мембранний фільтр (0.20 мкм; RC).

Розчини використовують щойноприготованими.

Хроматографування проводять на рідинному хроматографі з УФ-детектором за таких умов: колонка з нержавіючої сталі розміром 0.25 м x 4.6 мм, заповнена силікагелем для хроматографії

октадецилсилільним (5 мкм); рухома фаза А – вода для хроматографії; рухома фаза В – суміш метанол : ацетонітрил (50:50); рухома фаза С – 1.15 г амонію дигідрофосфату розчиняють у 1000 мл води для хроматографії, доводять рН розчину до 3.2 трифтороцтовою кислотою; використовують таку програму градієнта:

Час (хв)	фаза А, %	фаза В, %	фаза С, %	Швидкість (мл/хв)
0-14	0	5	95	1.0
14-22	0→2	5→0	95→98	1.0→0.6
22-22.5	2→0	0→2	98	0.6→2.0
22.5-38	0	2→60	98→40	2.0
38-50	0	60	40	2.0

Post time (2 хв.)

детектування – за довжини хвилі 225 нм; температура колонки – 30 °С; об'єм інжекції – 10 мкл; час утримання піка фавіпіравіру – близько 11 хв.

Хроматографують розчин порівняння та випробовуваний розчин за зазначених вище умов.

Потенціометричне титрування виконували на автоматичному титраторі Т50 М Terminal «Mettler Toledo» (Швейцарія) за допомогою скляного рН контактного електроду DG I 111-SC.

Методика

Близько 0.100 г (точна наважка) субстанції розчиняють у 50 мл води і титрують 0,1 М розчином натрію гідроксиду, використовуючи як індикатор 0.2 мл розчину фенолфталеїну.

Паралельно проводять контрольний дослід.

1 мл 0.1 М розчину натрію гідроксиду відповідає 15.71 мг $C_5H_4FN_3O_2$.

Результати дослідження

Фізико-хімічні властивості субстанції

В мас-спектрі розчину субстанції ФАВІПІРАВІР (іонізація в позитивному полі, електроспрей при атмосферному тиску) присутній пік молекулярного іону ($M + H$)⁺ зі значенням m/z 158.274, що відповідає розрахованій моноізотопній масі (M_{mi} 158.110). Дані наведено на рисунку 1.

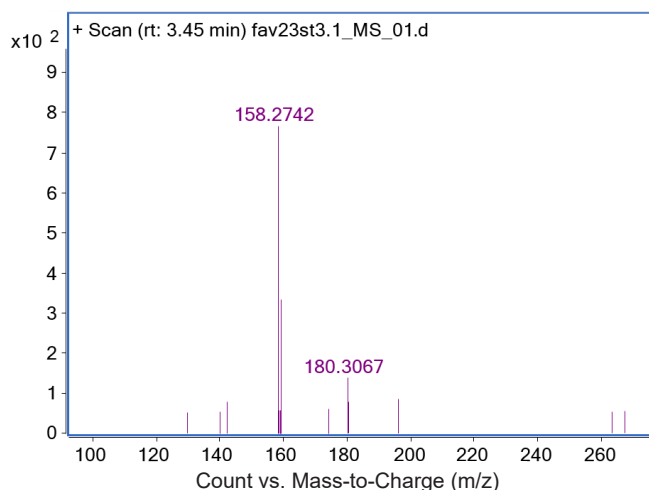


Рис. 1. Мас-спектр розчину субстанції ФАВІПІРАВІР.

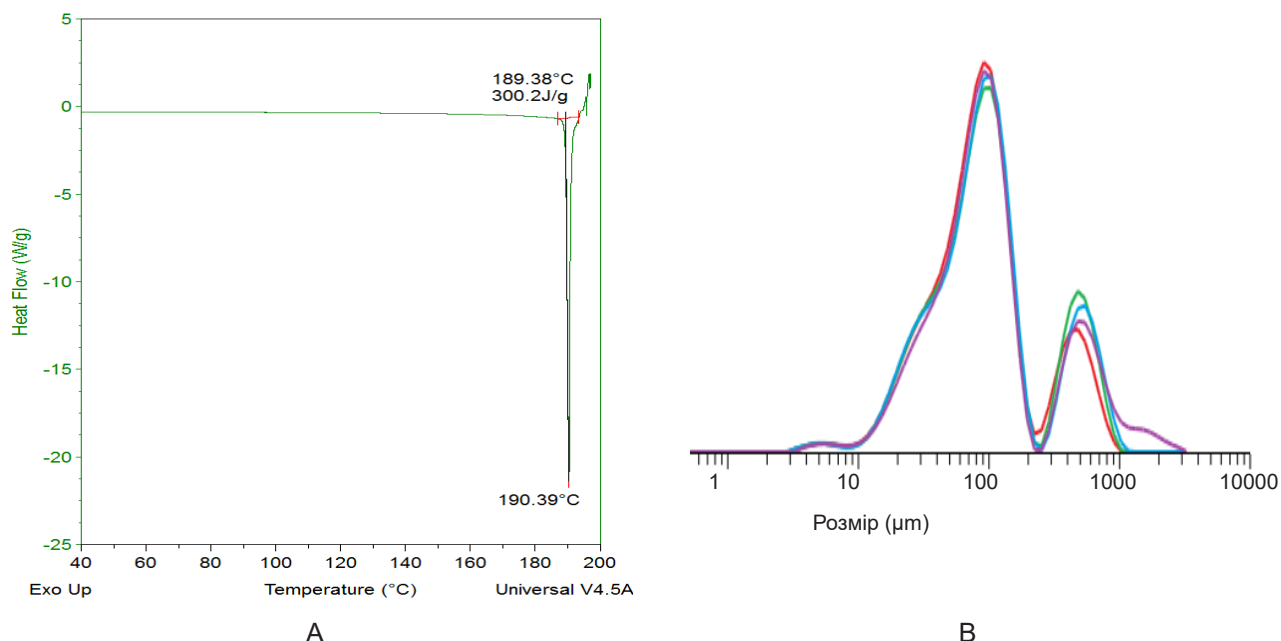


Рис. 2. Дериватограма (А) та густина розподілу частинок (В) субстанції ФАВІПІРАВІР.

Результати ДСК-дослідження для субстанції ФАВІПІРАВІР наведено на рисунку 2 (А). На дериватограмах зразків субстанції АФІ ФАВІПІРАВІР спостерігається ендотерма, що відповідає плавленню речовини при 189.38°C, з подальшою деструкцією речовини.

Методом лазерної дифрактометрії було визначено розподіл частинок субстанції ФАВІПІРАВІР за фракціями (гранулометричний склад). Результати визначення наведено на рисунку 2 (В).

Визначено, що розмір частинок порошку субстанції ФАВ становить: центральне значення розподілу $D_{x(50)}$ – 89 мкм, значення по краях розподілу $D_{x(10)}$ та $D_{x(90)}$ – 27 мкм та 493 мкм, що добре узгоджується з рекомендаціями, що середній розмір частинок не має перевищувати 100 мкм. Одержані дані можна використовувати для нормування розмірів частинок під час розроблення технології готових лікарських засобів.

Розробку методик контролю якості субстанції ФАВІПІРАВІР для аналітичної документації проводили згідно вимог ДФУ щодо субстанцій.

Розробка методик ідентифікації субстанції

Однією з фізичних характеристик субстанції вважається температура плавлення. Температура плавлення ФАВ становила від 187 °C до 193 °C.

Наявність гідроксильної групи в третьому положенні піразинового циклу в молекулі обумовлює здатність фавіпіравіру проявляти кислотно-основні властивості. Це дає змогу використовувати для ідентифікації абсорбційну спектрофотометрію в ультрафіолетовій ділянці спектру, на відміну від [7] при різних значеннях рН.

Можливе існування двох протонованих (неіонізованих), таутомерних форм A_1H та A_2H і однієї депротонованої (іонізованої) форми A^- . Це підтверджується характером електронних спектрів поглинання водних розчинів фавіпіравіру (рис.3). В спектрі фавіпіравіру в 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти присутні дві смуги за довжин хвиль 322 нм та 365 нм, які відповідають двом таутомерним формам A_1H та A_2H . В спектрі фавіпіравіру в 0.1 М розчині натрію гідроксиду присутня одна смуга за довжини хвилі 364 нм, яка відповідає одній іонізованій формі A^- .

Методика. 40.0 мг субстанції розчиняють у 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти (або 0.1 М розчині натрію гідроксиду), доводять об'єм розчину тим самим розчинником до 20.0 мл.

1.0 мл одержаного розчину поміщають у мірну колбу місткістю 100.0 мл, доводять об'єм розчину до позначки 0.1 М розчином хлористоводневої кислоти (або 0.1 М розчином натрію гідроксиду) та перемішують.

Компенсаційний розчин. 0.1 М розчин хлористоводневої кислоти (або 0.1 М розчині натрію гідроксиду).

Один із загальних методів ідентифікації субстанцій – інфрачервона спектрофотометрія. ІЧ-спектр ФАВ було одержано із використанням приставки АТР (пряме введення речовини). Інфрачервоний спектр поглинання субстанції повинен мати збіг положення смуг поглинання з положенням смуг поглинання спектру стандартного зразку фавіпіравіру, що додається (рис. 4).

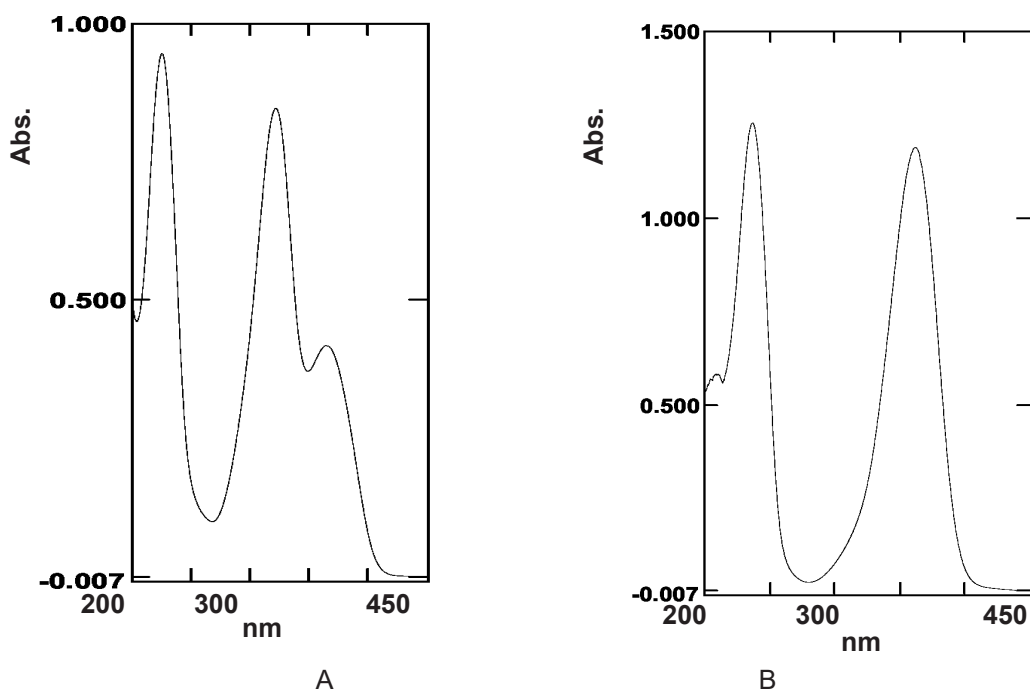


Рис. 3. Ультрафіолетові спектри поглинання розчину фавіпіравіру в 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти (А) та в 0.1 М розчині натрію гідроксиду (В).

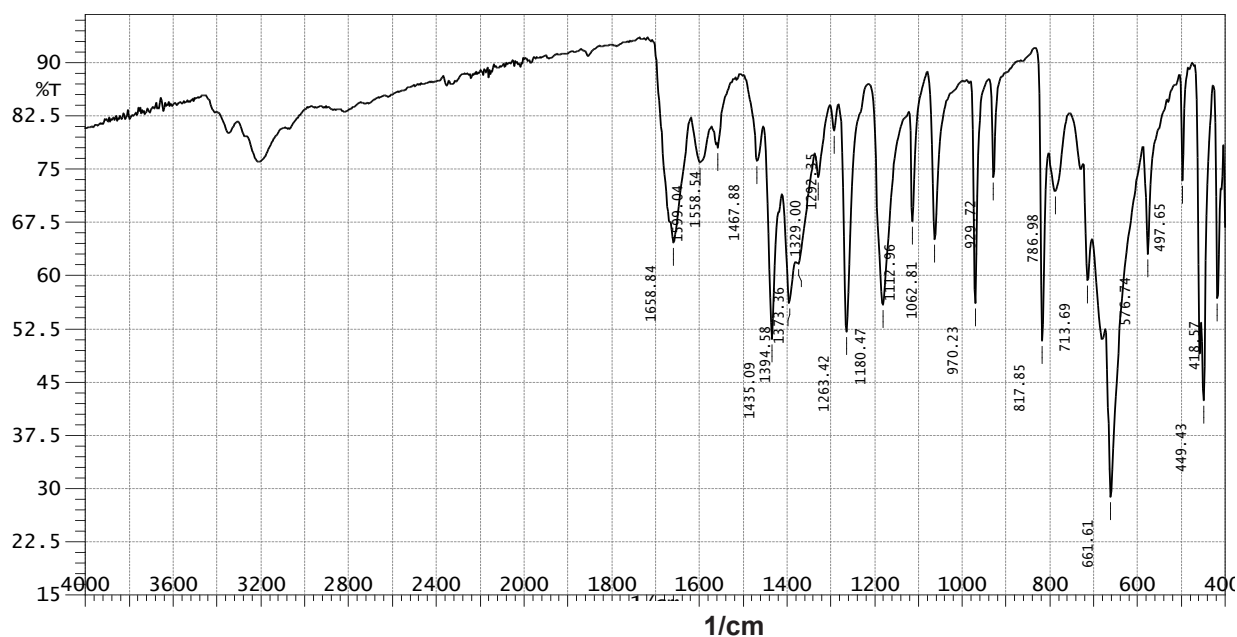


Рис. 4. ІЧ-спектр поглинання стандартного зразку фавіпіравіру.

Необхідно було довести наявність атому фтору. Для цього 0.05 г субстанції поміщують у фарфоровий тигель і спікають з 0.6 г натрію карбонату Р при температурі 600 °С протягом 1 години. Тигель охолоджують, вміст тигля розчиняють у 10 мл води. У мірну колбу місткістю 50.0 мл поміщують 0.5 мл одержаного розчину, додають 5.0 мл розчину амінометилалізариндіоцтової кислоти, 1.5 мл ацетатного буферного розчину, 5.0 мл розчину церію нітрату,

доводять до позначки водою та перемішують. Має з'являтися бузково-синє забарвлення (реакція на фторид-іон).

Розроблений тест «Ідентифікація» дозволяє довести будову фавіпіравіру.

Методики визначення основної речовини методом титрування та супровідних домішок методом рідинної хроматографії розроблено та валідовано згідно з [8] за такими показниками, як специфічність, лінійність, прецизійність та

правильність. Для прикладу детально наведено валідацію методики кількісного визначення.

Валідація методики визначення супровідних домішок

Хроматографічна система вважається придатною, якщо виконуються такі умови для розчину порівняння:

- ефективність хроматографічної колонки, розрахована за піком фавіпіравіру, становить не менше 3000 теоретичних тарілок;

- відносне стандартне відхилення для площі піка фавіпіравіру становить не більше 2.0 %.

Розрахунки здійснюють з урахуванням відповідних поправкових коефіцієнтів:

Домішка	Відносний час утримування	Поправковий коефіцієнт (F)
3,6-дихлорпіразин-2-карбонітрил	2.83	1.73
6-фтор-3-оксо-3,4-дигідропіразин-2-карбонітрил	1.60	0.71
6-бром-3-гідроксипіразин-2-карбоксамід	1.91	2.33

На хроматограмі випробовуваного розчину (рисунк 5):

- поправкові коефіцієнти: для розрахунку вмісту помножують площі піків наведених домішок на відповідний поправковий коефіцієнт;

- 3,6-дихлорпіразин-2 карбонітрил: площа піка домішки 3,6-дихлорпіразин-2-карбонітрилу не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (рисунк 6) (0.05 %);

- 6-фтор-3-оксо-3,4-дигідропіразин-2-карбонітрил: площа піка домішки 6-фтор-3-оксо-3,4-дигідропіразин-2-карбонітрилу не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.05 %);

- 6-бром-3-гідроксипіразин-2-карбоксамід: площа піка домішки 6-бром-3-гідроксипіразин-2-карбоксаміду не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.05 %);

- неспецифіковані домішки: площа піка будь-якої іншої домішки не має перевищувати 0.5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.05 %);

- сума домішок: сума площ усіх піків, крім основного піка, не має перевищувати 5 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.5 %);

- не враховують: домішки, площа піків яких становить менше 0.3 площі основного піка на хроматограмі розчину порівняння (0.03 %).

При розробці методів стандартизації субстанції слід було врахувати, що субстанція не фармакопейна та стандартні зразки домішок, порівняно з якими інтерпретуються результати аналізу, мають високу вартість. Тому першочерговим завданням була розробка методики тесту "Супровідні домішки", у якій домішки визначають за розведеною субстанцією з використанням поправкових коефіцієнтів.

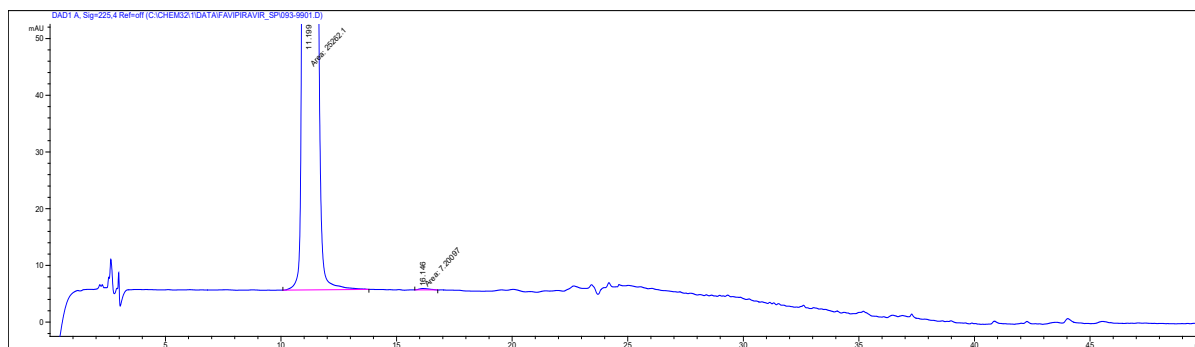


Рис. 5. Хроматограма випробовуваного розчину, одержана при виконанні тесту "Супровідні домішки".

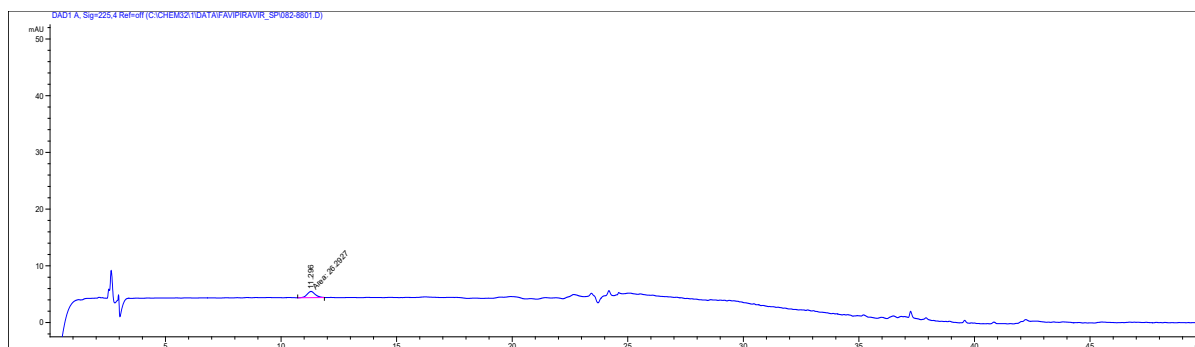


Рис. 6. Хроматограма розчину порівняння, одержана при виконанні тесту "Супровідні домішки".

Валідація методики кількісного визначення основної речовини

Не менше 98.0 % і не більше 102.0 % $C_5H_4FN_3O_2$ (фавіпіравіру), у перерахунку на безводну речовину.

Вимоги до повної невизначеності результатів аналізу

Повна невизначеність результатів аналізу для кількісного визначення розраховується із меж вмісту основної речовини за специфікацією [8]:

$\Delta_{As} \leq B_H - 100\%$, де: Δ_{As} – повна невизначеність результатів аналізу, у відсотках; B_H – верхня межа вмісту основної речовини за специфікацією, у відсотках. Для допусків вмісту основної речовини в АФІ ФАВІПІРАВІР встановлено межі не менше 98.0 % і не більше 102.0 %. Таким чином, максимально допустима невизначеність результатів аналізу складає:

$$\max \Delta_{As} = 102 - 100 = 2 (\%).$$

Чистота субстанції, що використовується для проведення валідації.

Для проведення валідації методики титрування використовувалась серія FIR0641120 АФІ ФАВІПІРАВІР, порошок (субстанція), що відповідала вимогам специфікації. При цьому вміст води складає 0.12 %, вміст супровідних домішок – 0.032 %. В подальших розрахунках вміст основної речовини приймали за 100.0 %.

Перевірка лінійності

Номинальний об'єм титрування

$$V_T = \frac{m_T}{K_T \cdot m_{imL}} \cdot \left(1 - \frac{LD}{100}\right) \cdot \frac{NC}{100},$$

де m_T – номінальна наважка, у міліграмах; K_T – коефіцієнт поправки до номінальної концентрації титранту; m_{imL} – кількість міліграм фавіпіравіру, що відповідають 1 мл титранту; LD – вміст води, у відсотках; NC – номінальний вміст фавіпіравіру в АФІ, у відсотках.

Номинальний об'єм титрування складає 63.6 % від об'єму бюретки місткістю 10 мл, тобто відповідає вимогам ДФУ діючої редакції.

Отримані результати, у нормалізованих координатах, апроксимували лінійною функцією $Y = a + b \cdot X$.

Параметри лінійної регресії оцінювали методом найменших квадратів (МНК). Критерії для перевірки лінійності методики ґрунтуються на тому, що в нормалізованих координатах, за відсутності систематичних помилок, вільний член регресії (адитивна систематична похибка) повинен дорівнювати нулю ($a = 0$), а кутовий коефіцієнт (мультиплікативна систематична похибка) – одиниці ($b = 1$).

Відхилення МНК-оцінки вільного члена від нуля визнавалося статистично незначним, на рівні значимості $\alpha = 0.05$, якщо виконувалася умова:

$$|a| \leq s_a \cdot t_{1-\alpha}(n-2),$$

де: s_a – стандартне відхилення МНК-оцінки параметра a , $t_{1-\alpha}(n-2)$ – одностороння квантиль розподілу Стюдента.

Відхилення МНК-оцінки кутового коефіцієнта від 1 визнавалося статистично незначним, якщо виконувалася умова:

$$|1 - b| \leq s_b \cdot t_{1-\alpha}(n-2),$$

де: s_b – стандартне відхилення МНК-оцінки параметра b .

Для перевірки практичної прийнятності відхилення лінії регресії від лінії $Y = X$ регламентували систематичні похибки на межах діапазону застосування методики (80 % – 120 %):

$$\delta_{80} = |a + (1 - b) \cdot 80| \leq \frac{2}{3} \max \Delta_{As} = \frac{2}{3} \cdot 2 = 1,33;$$

$$\delta_{120} = |a + (1 - b) \cdot 120| \leq \frac{2}{3} \max \Delta_{As} = \frac{2}{3} \cdot 2 = 1,33.$$

Практичну прийнятність випадкового розкиду точок щодо лінії регресії оцінювали за допомогою умови для залишкового стандартного відхилення:

$$s_0 \leq \frac{\sqrt{k}}{3} \frac{\max \Delta_{As}}{t_{1-\alpha}(n-2)}.$$

Практичну прийнятність систематичного відхилення точок від прямої лінії оцінювали за допомогою умови для коефіцієнта кореляції:

$$r \leq \sqrt{1 - \left(\frac{1}{3} \frac{\sqrt{k} \cdot \max \Delta_{As}}{S_x \cdot t_{1-\alpha}(n-2)} \right)^2},$$

де: k – кількість титрування при рутинному виконанні аналізу ($k \geq 3$); S_x – стандартне відхилення діапазону у нормалізованих координатах.

Наважки для вивчення лінійності

Брали наважки АФІ ФАВІПІРАВІР, порошок (субстанція) для різних точок (i) прямої, що складали 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 та 120 % від номінальної маси 100 мг. Для дослідження відтворюваності результатів для різних випробувань щодо вивчення лінійності брали по 2 наважки для кожної точки (i), позначаючи їх відповідними індексами, такими як i_1 та i_2 (таблиця 1). Відповідно, отримували 2 набори по 9 точок (результатів титрування), які окремо обробляли методом найменших квадратів. Для порівняння обробляли також об'єднану вибірку із 18 точок.

Нормалізовані координати

В титруванні для переведення в нормалізовані координати наважку m_p , що досліджується, доцільно розділити на номінальну наважку m_T , що вказується в методиці. Номінальний наважці m_T відповідає номінальний об'єм титрування V_T , а

наважці m_p , що досліджується – встановлений для неї об'єм титранту ($V_i - V_0$), де V_0 – об'єм, витрачений на титрування холостого випробування. Відповідно, отримуємо наступні нормалізовані координати:

$$X_i (\%) = \frac{m_i}{m_T} \cdot 100; \quad Y_i (\%) = \frac{V_i - V_0}{V_T} \cdot 100;$$

$$Y_i (\%) = \frac{V_i - V_0}{V_T} \cdot 100;$$

Величини X_i , Y_i та Z_i мають такий же зміст, що і для хроматографічного аналізу методом стандарту.

Зокрема, Z_i представляє собою коефіцієнт вилучення, тобто відношення знайдено/введено, у відсотках.

Результати обробки по прямій методом найменших квадратів кожного із двох наборів 9 точок (різні аналітики у 2 дні) представлені в таблиці 1. Критерії взяті з ДФУ діючої редакції [8]. Для порівняння обробляли також об'єднану вибірку з 18 точок, для якої окремо розраховували критерії за принципами, описаними вище. Регресії еквівалентного об'єму титранту від вмісту АФІ в нормалізованих координатах строго лінійні (рисунк 7).

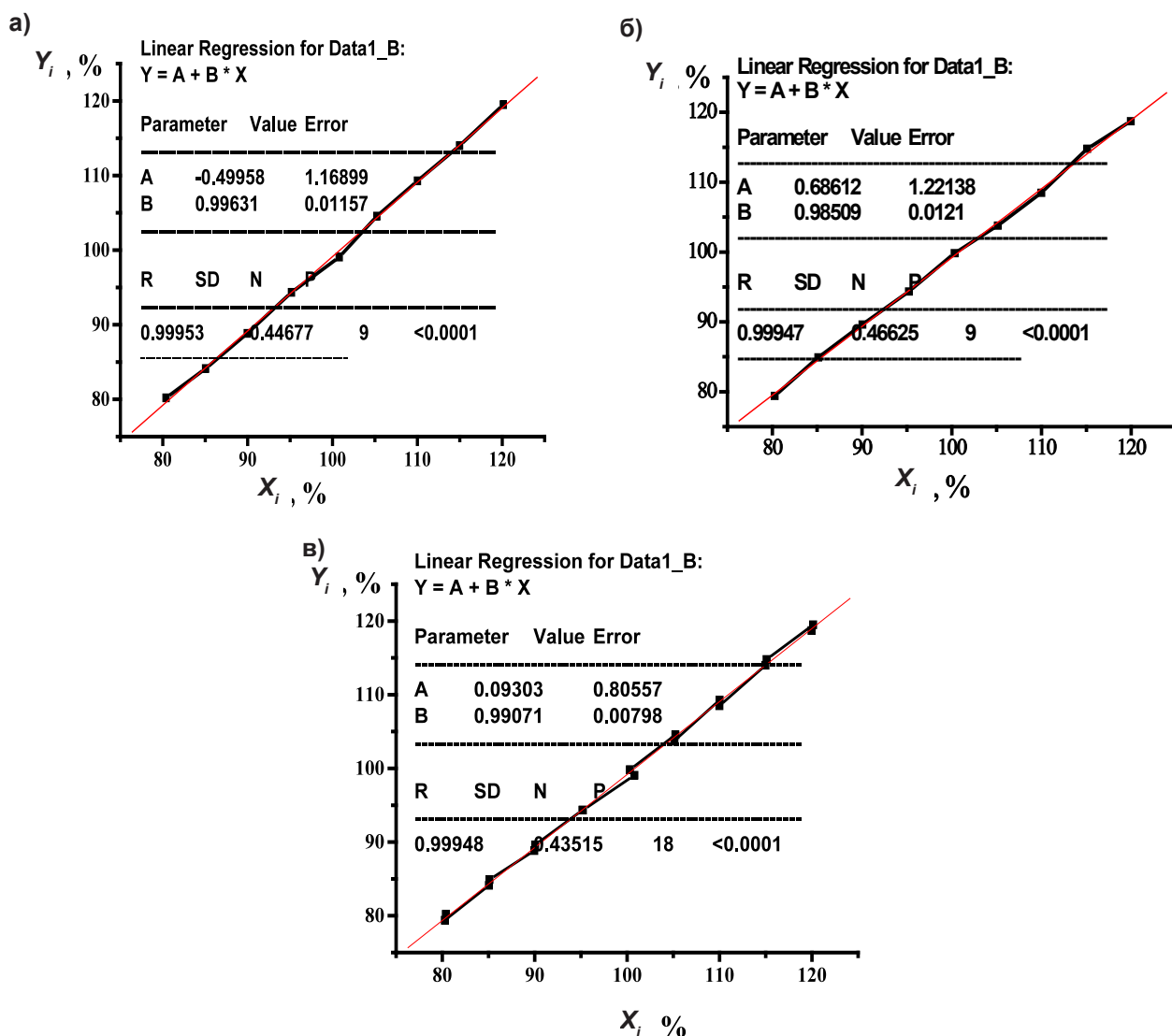


Рис. 7. Графік залежності об'єму титранту від маси наважки АФІ ФАВІПІРАВІР, порошок (субстанція) в нормалізованих координатах для перших 9 точок (i_1) (а), других 9 точок (i_2) (б) та для 18 точок (в).

Таблиця 1. Результати перевірки лінійності.

Параметр	Значення	Стандартне відхилення	Критерій статистичної незначущості	Критерій практичної прийнятності	Висновок
набір i_1					
$ a $	0.5	1.17	≤ 2.22		відпов.
$ 1 - b $	0.00369	0.01157	≤ 0.02192		відпов.
s_0	0.45			≤ 0.61	відпов.
r	0.99953			≥ 0.99900	відпов.
δ_{80}	0.2			≤ 1.33	відпов.
δ_{120}	0.06			≤ 1.33	відпов.
загальний висновок про лінійність для набору i_1					відпов.
набір i_2					
$ a $	0.69	1.22	≤ 2.31		відпов.
$ 1 - b $	0.01491	0.0121	≤ 0.02292		відпов.
s_0	0.47			≤ 0.61	відпов.
r	0.99947			≥ 0.99900	відпов.
δ_{80}	0.5			≤ 1.33	відпов.
δ_{120}	1.1			≤ 1.33	відпов.
загальний висновок про лінійність для набору i_2					відпов.
всі 18 точок					
$ a $	0.09	0.81	≤ 1.41		відпов.
$ 1 - b $	0.00929	0.00798	≤ 0.01393		відпов.
s_0	0.44			≤ 0.66	відпов.
r	0.99948			≥ 0.99875	відпов.
δ_{80}	0.65			≤ 1.33	відпов.
δ_{120}	1.02			≤ 1.33	відпов.
загальний висновок про лінійність для набору 18 точок					відпов.

Як видно з таблиці 1, вимоги до одночасної статистичної незначущості величин $|a|$ та $|b - 1|$ виконується для двох наборів з 9 точок та всього набору з 18 точок. Обидва набори з 9 точок та об'єднаний набір з 18 точок задовольняють вимогам практичної прийнятності лінійної залежності. Порівняння наборів i_1 та i_2 показує, що відмінність параметрів лінійної залежності не змінює висновок про прийнятність лінійної залежності як для наборів з 9 точок, так і для розширеного набору з 18 точок. Даний результат свідчить про відтворюваність валідаційних досліджень лінійності.

Перевірка прецизійності та правильності

Правильність методики [8] характеризується систематичною складовою невизначеності $\delta(\%)$, яку визначали абсолютним відхиленням середнього значення коефіцієнта вилучення

для відношення «знайдено/ведено» $\bar{Z}$ від 100 % (таблиця 2):

$$\delta = |\bar{Z} - 100|.$$

Правильність оцінювали за двома критеріями.

Систематична похибка статистично не відрізняється від нуля, якщо відхилення від 100% не перевищує свого довірчого інтервалу:

$$\delta \leq \frac{\Delta_z}{\sqrt{n}},$$

де: $\Delta_z \leq S_z \cdot t_{1-\alpha}(n - 1)$, S_z – стандартне відхилення значень Z_i коефіцієнта вилучення.

Якщо умова статистичної незначущості не виконувалася, то систематична похибка вважалася практично прийнятною, якщо вона

незначна порівняно з максимально допустимою невизначеністю аналізу:

$$\delta \leq \frac{2}{3} \max \Delta_{As} = \frac{2}{3} \cdot 2 = 1,33.$$

Прецизійність методики визнавалася задовільною, якщо для одностороннього довірчого інтервалу коефіцієнта вилучення Δ_z виконувалася вимога

$$\Delta_z \leq \frac{\sqrt{k}}{3} \max \Delta_{As} = \frac{\sqrt{3}}{3} \cdot 2 = 1,15.$$

Як видно з наведених розрахунків вимога статистичної незначущості не виконується. Вимоги щодо практичної незначущості систематичної похибки виконуються. Таким чином, правильність методики задовольняє необхідним вимогам.

Наведені розрахунки також свідчать про задовільну внутрішньолабораторну прецизійність. Таким чином, методика відповідає вимогам прецизійності та правильності.

Таблиця 2. Результати дослідження прецизійності та правильності.

X _i , %	Y _i , %	Z _i , %	X _i , %	Y _i , %	Z _i , %	X _i , %	Y _i , %	Z _i , %
усі 18 точок			набір i_1			набір i_2		
80.38	80.19	99.76	80.38	80.19	99.76	80.27	79.40	98.92
80.27	79.40	98.92	85.04	84.12	98.92	85.11	84.91	99.77
85.04	84.12	98.92	89.96	88.84	98.76	90.05	89.62	99.52
85.11	84.91	99.77	95.17	94.34	99.13	95.22	94.34	99.08
89.96	88.84	98.76	100.80	99.06	98.27	100.31	99.84	99.53
90.05	89.62	99.52	105.23	104.56	99.36	105.12	103.77	98.72
95.17	94.34	99.13	110.01	109.28	99.34	109.99	108.49	98.64
95.22	94.34	99.08	114.98	113.99	99.14	115.09	114.78	99.73
100.80	99.06	98.27	120.13	119.50	99.48	119.96	118.71	98.96
100.31	99.84	99.53						
105.23	104.56	99.36						
105.12	103.77	98.72						
110.01	109.28	99.34						
109.99	108.49	98.64						
114.98	113.99	99.14						
115.09	114.78	99.73						
120.13	119.50	99.48						
119.96	118.71	98.96						
$\bar{Z}$, %		99.17			99.13			99.21
S _z , %		0.43			0.44			0.43
δ, %		0.83			0.87			0.79
перевірка правильності статистична незначущість								
$\Delta_z/\sqrt{n}$		0.18		0.27			0.27	
не відповідає			не відповідає			не відповідає		
практична прийнятність								
відповідає			відповідає			відповідає		
перевірка прецизійності (k = 3)								
Δ_z , %		0.43		0.47			0.46	
відповідає			відповідає			відповідає		

Висновок

За допомогою сучасних методів аналізу встановлено фізико-хімічні властивості субстанції фавіпіравіру.

Розроблено методики тесту «Ідентифікація» та доведено будову фавіпіравіру.

Розроблено та валідавано ВЕРХ-методику визначення супровідних домішок та методику

кількісного визначення основної речовини фавіпіравіру.

За результатами валідації встановлено, що наведені методики специфічні, характеризуються коректною точністю, правильністю, лінійною залежністю у вивченому діапазоні концентрацій, що дозволяє використовувати їх для контролю якості субстанції.

Література

1. WHO. Novel coronavirus – Thailand (ex-China). Geneva: World Health Organization, Jan 14, 2020. <https://www.who.int/csr/don/14-january-2020-novel-coronavirus-thailand/en/> (accessed Jan 23, 2020)
2. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K. et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor. *Antiviral Res.* 2013, 100, 446-454.
3. Bulduk I. HPLC-UV method for quantification of favipiravir in pharmaceutical formulations. *Acta Chromatographica.* 2021, 33 (3), 209-215. <https://doi.org/10.1556/1326.2020.00828>
4. Liu C., Zhang Yu., Bu L., Liu Y., Liu L. Content Determination of Favipiravir Tablets by HPLC. *China Pharmacist.* 2015, 18 (7). http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotat-ZYSG201507057.htm
5. Marzouk H.M., Rezk M.R., Gouda A.S., Abdel-Megied A.M. A novel stability-indicating HPLC-DAD method for determination of favipiravir, a potential antiviral drug for COVID-19 treatment; application to degradation kinetic studies and in-vitro dissolution profiling. *Microchem J.*, 2022, 172, 106917. doi: 10.1016/j.microc.2021.106917
6. Egorova A.V., Skripinec Yu.V., Leonenko I.I., Umeckaya I.V., Vojtyuk O.D. Opredelenie ostatochnykh kolichestv na poverkhnostyakh farmacevticheskogo oborudovaniya metodami VERH, lyuminescencii i spektrofotometrii. *Visnik Odes'kogo nacion. un-tu. Khimiya.* 2020, 25, 4(76), 45-55. DOI:[http://dx.doi.org/10.18524/2304-0947.2020.4\(76\).216925](http://dx.doi.org/10.18524/2304-0947.2020.4(76).216925)
7. IMWP, Monographs on Favipiravir and on Favipiravir tablets, 2021 <https://www.who.int/publications/m/item/imwp-monographs-on-favipiravir-and-on-favipiravir-tablets>
8. Derzhavna Farmakopeia Ukrainy: v 3 t. / Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv». – 2-e vyd. - Dopovnennia 4. – Kharkiv: Derzhavne pidpriemstvo «Ukrainskyi naukovyi farmakopeinyi tsentr yakosti likarskykh zasobiv», 2020, 123-236.