

УДК 615.07:543.48

**Ю. В. Скрипинець¹, Г. О. Федосенко², Г. В. Мальцев², І. І. Чеботарська¹,
Д. І. Александрова¹, С. М. Кашуцький², А. В. Єгорова¹**¹Фізико-хімічний інститут ім. О.В.Богатського НАН України,

Лютторфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна

²ТДВ «ІНТЕРХІМ», Лютторфська дорога, 86, Одеса, 65080, Україна**ВИЗНАЧЕННЯ КОНСТАНТИ ІОНІЗАЦІЇ АФІ ФАВІПІРАВІРУ**

За даними кислотно-основного титрування була визначена константа іонізації АФІ фавіпіравіру: $pK_a = 5.05 \pm 0.02$. На підставі знайденого значення pK_a були розраховані ступені утворення протолітичних форм в залежності від pH розчину. Встановлено, що АФІ фавіпіравіру в розчинах існує в двох протонуваних (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H і одній депротонуваній (іонізованій) формі A^- .

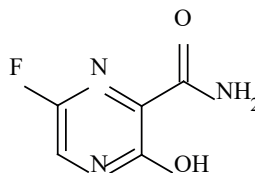
На етапі фармацевтичної розробки ці дані по кислотно-основним властивостям АФІ фавіпіравіру можуть бути використані при розробці технології виробництва, створення методик контролю якості та їх валідації, а також при вивченні розчинності АФІ та профілів розчинення готового лікарського засобу.

Ключові слова: фавіпіравір, потенціометричне титрування, константа іонізації, протолітична функція утворення

Одним із аспектів вивчення фізико-хімічних властивостей сполук є встановлення їхніх констант іонізації. Ці показники є вкрай важливими як з теоретичного, так і з практичного погляду. А з біологічної точки зору значення констант іонізації сполук допоможе вірно зорієнтуватись в якому саме відділі шлунково-кишкового тракту відбудеться всмоктування тієї чи іншої речовини, якщо мова йде про пероральне застосування потенційних ліків [1].

Визначення pK_a , як правило, завдання класичних фізико-хімічних методів, таких як спектрофотометрія, кондуктометрія, потенціометрія, їх модифікацій [2, 3]. Актуальним є пошук нових способів вивчення рівноваг в розчинах. Авторами [4] показана перспективність кольориметрії при вивченні кислотно-основних властивостей і встановлення відповідних величин pK_a барвників.

З 2019 року поширився новий вірус SARS-CoV-2. З'явився значний інтерес для використання противірусних агентів проти COVID-19 [5]. Фавіпіравір (ФАВ) – пероральний противірусний препарат, схвалений для лікування грипу в Японії.



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

Метою цієї роботи було провести теоретичний аналіз протолітичних рівноваг АФІ фавіпіравіру та потенціометричне титрування його водного розчину, за даними титрування розрахувати протолітичну функцію утворення в кожній точці рН та визначити константу іонізації АФІ фавіпіравіру.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В роботі використовували реактиви кваліфікації не нижче ч.д.а. Для приготування розчинів застосовували дистильовану воду. Дослідження проводили на зразках субстанції ФАВ серія WD-A002-200402 (Cangzhou Wisdom Pharma Co., Ltd, Китай). Визначення було виконано відповідно до вимог Державної фармакопеї України (ДФУ) [6].

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

Потенціометричне титрування проводилося на автоматичному титраторі T50 M Terminal «Mettler Toledo» (Швейцарія) за допомогою скляного рН контактного електроду DG I 111-SC.

Електронні спектри поглинання реєстрували на спектрофотометрі UV-2401 PC Shimadzu (Японія).

0.15 М розчин натрію хлориду: 4.39 г натрію хлориду розчиняли в воді деіонізованій, без діоксиду вуглецю, та доводили об'єм розчину до 500.0 мл.

0.004 М розчин кислоти хлористоводневої: у мірну колбу місткістю 50.0 мл поміщали 2.0 мл 0.1 М розчину кислоти хлористоводневої, доводили до позначки 0.15 М розчином натрію хлориду.

0.1 М розчин натрію гідроксиду: у мірну колбу місткістю 50.0 мл поміщали 5.0 мл 1 М розчину натрію гідроксиду, доводили до позначки 0.15 М розчином натрію хлориду.

Встановлення титру 0.1 М розчину натрію гідроксиду: 5.0 мл приготованого розчину натрію гідроксиду титрували розчином 0.1 М кислоти хлористоводневої, використовуючи у якості індикатору метилоранж.

Робочий розчин: наважку АФІ фавіпіравіру 25.0 мг поміщали у хімічний стакан, додавали 25.0 мл 0.15 М розчину натрію хлориду, перемішували на магнітній мішалці до повного розчинення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Титрували робочий розчин 0.1 М розчином натрію гідроксиду з використанням скляного електроду.

На рис. 1 наведена крива титрування робочого розчину фавіпіравіру.

Наявність гідрокси групи в третьому положенні піразинового циклу в молекулі обумовлює здатність фавіпіравіру проявляти кислотно-основні властивості. Крім цього, можливе існування двох таутомерних форм фавіпіравіру. На рис. 2 наведена схема протолітичних та таутомерних рівноважних перетворень фавіпіравіру. Таким чином, фавіпіравір в розчинах існує в двох протонованих (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H і одній депротонованій (іонізованій) формі A^- . Це підтверджується характером електронних спектрів поглинання водних розчинів фавіпіравіру.

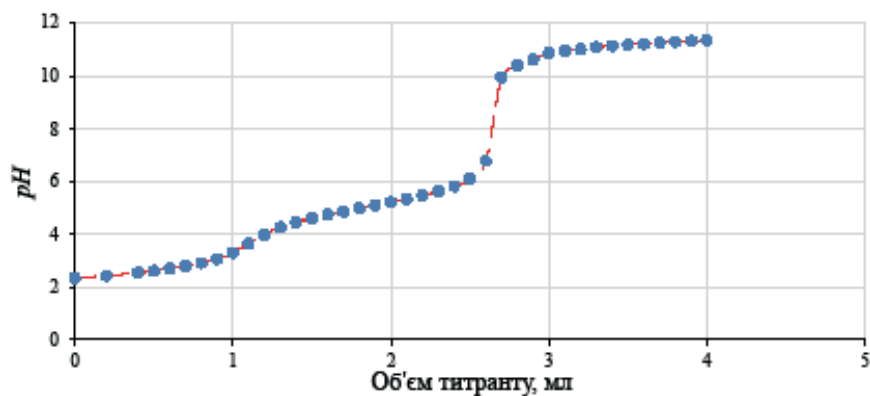


Рис. 1. Крива титрування робочого розчину фавіпіравіру

Fig. 1. Titration curve of favipiravir working solution

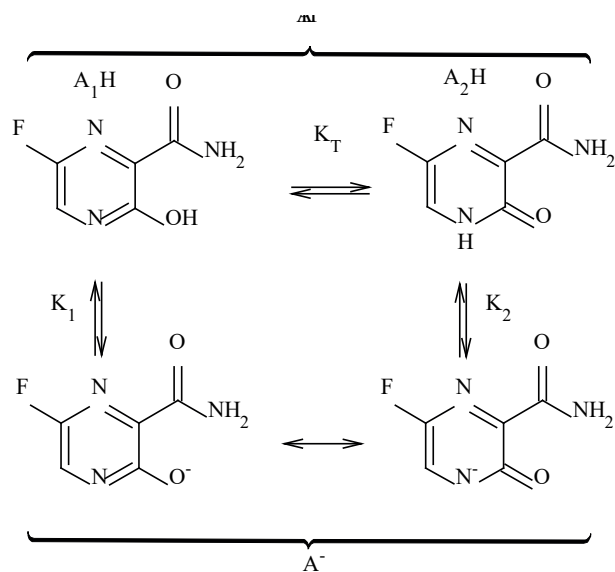


Рис. 2. Схема протолітичних та таутомерних рівноважних перетворень фавіпіравіру

Fig. 2. Scheme of protolytic and tautomeric equilibrium transformations of favipiravir

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^- (рис. 3).

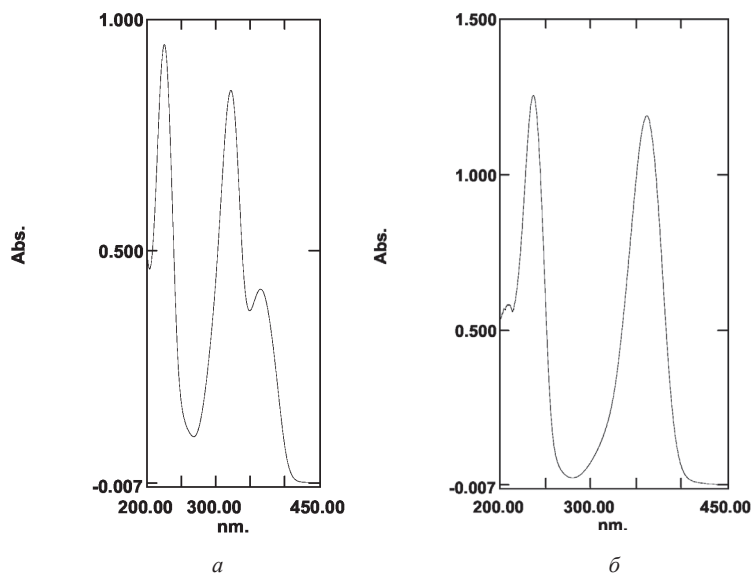


Рис. 3. Ультрафіолетові спектри поглинання розчину фавіпіравіру в 0.1 М розчині хлористоводневої кислоти (а) та в 0.1 М розчині натрію гідроксиду (б)

Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of favipiravir solution in 0.1 M hydrochloric acid solution (a) and in 0.1 M sodium hydroxide solution (b)

Розрахунок констант іонізації за даними кислотно-основного титрування проводиться за допомогою функції утворення (функції Б'єрума). Функція утворення, яка характеризується як середнє число зв'язаних протонів, визначається наступним виразом [7–9]:

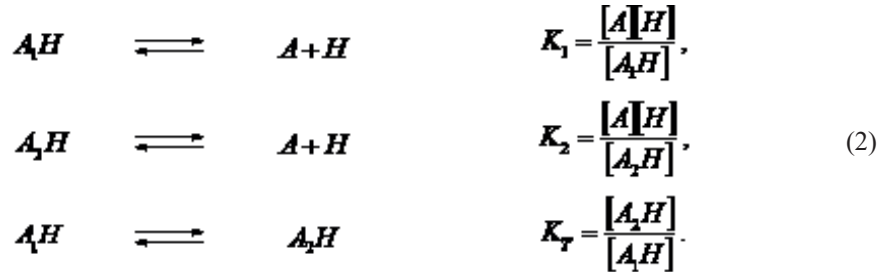
$$\bar{n}_H = \frac{C_H - f_H}{C_A}$$

де C_H – загальна концентрація протонів, які дисоціюють;

C_A – загальна концентрація речовини;

f_H – концентрація незв'язаних протонів у розчині за вираховуванням концентрації протонів, що утворюються при іонізації протонного розчинника (для водних розчинів $f_H = [H^+] - [OH^-] = [H^+] - \frac{K_w}{[H^+]}$, де K_w – іонний добуток води).

Розглянемо протолітичні рівноваги фавіпіравіру (для зручності подальшого викладу заряди частинок опускаються) у розчині при постійній іонній силі:



Визначивши систему, можна написати рівняння матеріального балансу для загальних концентрацій частинок:

$$C_A = [A] + [A_1H] + [A_2H], \quad (3)$$

$$C_H - f_H = [A_1H] + [A_2H], \quad (4)$$

Підставляючи рівняння (3) та (4) в рівняння (1), отримаємо

$$\bar{n}_H = \frac{[A_1H] + [A_2H]}{[A] + [A_1H] + [A_2H]}, \quad (5)$$

З системи рівнянь (2) випливає:

$$K_1 = K_T \cdot K_2, [A_1H] + [A_2H] = [A_1H] \cdot (1 + K_T). \quad (6)$$

Позначимо $\frac{1}{K} = \frac{1}{K_1} + \frac{1}{K_2}$ (7)

Підстановкою рівнянь (6) в рівняння (5) та з огляду на систему (2), отримаємо:

$$\bar{n}_H = \frac{\frac{1}{K} \cdot [H]}{1 + \frac{1}{K} \cdot [H]} = \frac{10^{pK - pH}}{1 + 10^{pK - pH}}. \quad (8)$$

З рівняння (8) можна визначити значення pK_a , якщо відомо значення функції утворення в кожній точці pH :

$$pK = \lg\left(\frac{\bar{n}_H}{1 - \bar{n}_H}\right) + pH. \quad (9)$$

Функцію утворення для кожного значення pH розраховували за даними потенціометричного титрування за формулою:

$$\bar{n}_H = 1 + \frac{C_{HCl}}{C_A} - \frac{(V_0 + v)}{V_0} \cdot \frac{f_H}{C_A} - \frac{v}{V_0} \cdot \frac{C_{NaOH}}{C_A}, \quad (10)$$

де C_{HCl} – концентрація хлористоводневої кислоти в робочому розчині;
 C_{NaOH} – концентрація титранту;
 V_0 – вихідний об'єм розчину, що титрують;
 v – об'єм титранту.

РОЗРАХУНОК ФУНКЦІЇ УТВОРЕННЯ ТА КОНСТАНТИ ІОНІЗАЦІЇ

Використовуючи вираз (10) на підставі даних потенціометричного титрування були розраховані значення функції утворення в кожній точці рН (табл. 1, рис. 4).

Константу іонізації розраховували за формулою (9). Розрахунок константи наведено в табл. 1. Розрахована таким чином константа іонізації АФІ Фавіпіравіру у водному розчині при 22 °С: $pK_a = 5.05 \pm 0.02$.

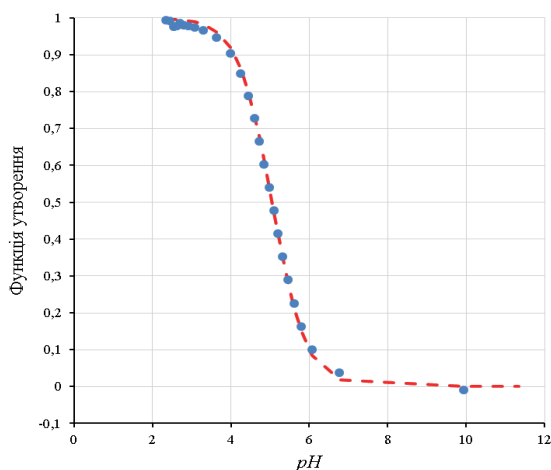


Рис. 4. Залежність функції утворення від рН розчину АФІ фавіпіравіру

Fig. 4. Dependence of the formation function on the pH of the favipiravir API solution

Таблиця 1

Розрахунок константи іонізації фавіпіравіру
(фоновий електроліт 0.15 М розчин натрію хлориду, температура 22 °С)

Table 1

Calculation of the ionization constant of favipiravir
(background electrolyte 0.15 M sodium chloride solution, temperature 22 °C)

pH	\bar{n}_H	$pK_a = \lg \left(\frac{\bar{n}_H}{1 - \bar{n}_H} \right) + pH$	pK_a , середнє	$\pm \Delta$, $P = 95 \%, n = 11$
4.26	0.8473	5.004	5.05	0.02
4.45	0.7874	5.019		
4.61	0.7262	5.034		
4.74	0.6641	5.036		
4.86	0.6018	5.039		
4.98	0.5393	5.048		
5.10	0.4766	5.059		
5.21	0.4139	5.059		
5.33	0.3510	5.063		
5.47	0.2882	5.077		
5.62	0.2253	5.084		

АНАЛІЗ ПРОТОЛІТИЧНИХ ФОРМ ФАВІПІРАВІРУ

АФІ Фавіпіравіру в розчинах існує в двох протонуваних (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H і одній депротонуваній (іонізованій) формі A^- (рис. 5).

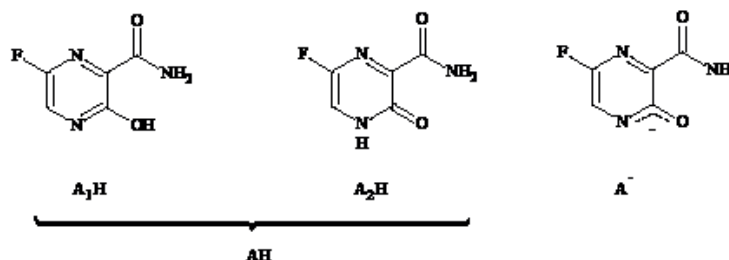


Рис. 5. Протолітичні та таутомерні форми АФІ фавіпіравіру у водних розчинах

Fig. 5. Protolytic and tautomeric forms of API favipiravir in aqueous solutions

На підставі знайденого значення pK_a фавіпіравіру були розраховані ступені утворення протолітичних форм в залежності від pH розчину:

$$\frac{[AH]}{C_A} = \frac{[A_1H] + [A_2H]}{C_A} = \frac{10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (11)$$

$$\frac{[A^-]}{C_A} = \frac{1}{1 + 10^{pK_a - pH}}$$

На рисунку 6 представлені розраховані залежності ступенів утворення протолітичних форм АФІ Фавіпіравіру від значень pH середовища. На підставі проведених розрахунків можна зробити наступні висновки:

- при значенні pH розчину від 0 до 3.5 приблизно 100% речовини буде знаходитися в двох протонуваних (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H ;
- при значенні $pH = 5$ приблизно 50% речовини буде знаходитися в двох протонуваних (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H ;
- при значенні $pH > 6.5$ приблизно 100% речовини буде знаходитися в одній депротонуваній (іонізованій) формі A^- .

Значення ступенів утворення протолітичних форм (в %) для точок pH 1.2, 4.5 та 6.8 наведені в табл. 2:

Таблиця 2

Значення ступенів утворення протолітичних форм АФІ фавіпіравіру

Table 2

The value of degrees of formation of protolytic forms of API favipiravir

pH	Ступінь утворення протолітичних форм, %	
	A^-	$AH = A_1H + A_2H$
1.2	0	100
4.5	22	78
6.8	98	2

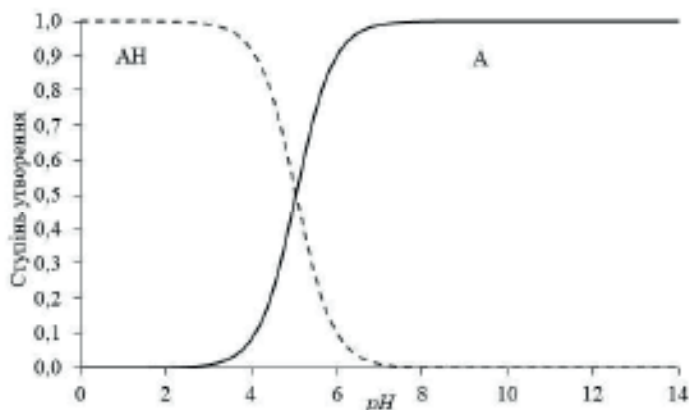


Рис. 6. Залежності ступенів утворення протолітичних форм АФІ фавіпіравіру від значень рН середовища

Fig. 6. Dependence of degrees of formation of protolytic forms of API favipiravir on pH values of the medium

ВИСНОВКИ

За даними кислотно-основного титрування була визначена константа іонізації АФІ фавіпіравіру при 22 °С (фоновий електроліт – 0.15 М розчин натрію хлориду): $pK_a = 5.05 \pm 0.02$. На підставі знайденого значення pK_a АФІ фавіпіравіру були розраховані ступені утворення протолітичних форм в залежності від рН розчину. Встановлено, що АФІ фавіпіравіру в розчинах існує в двох протонуваних (неіонізованих), таутомерних формах A_1H та A_2H і одній депротонуваній (іонізованій) формі А.

Дані по кислотно-основним властивостям АФІ фавіпіравіру можуть бути використані при розробці технології виробництва, створення методик контролю якості та їх валідації, а також при вивченні розчинності АФІ та профілів розчинення готового лікарського засобу.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Саліонов В.О., Авраменко А.І., Каплаушенко А.Г., Панасенко О.І., Книш С.Г. Визначення констант іонізації солей, похідних 2-(4-*R*-5(тіофен-2-іл)-1,2,4-триазол-3-ілтіо)ацетатних кислот // Фармацевтичний журнал. – 2014. – № 1. – С. 74-80.
2. Zevatskii Yu.E., SamoiloV D.V., Mchedlov–Petrosyan N.O. Contemporary methods for the experimental determination of dissociation constants of organic acids in solutions // Russ. J. Gen. Chem. – 2009. – Vol. 79, N 9. – P. 1859–1889. <https://doi.org/10.1134/S1070363209090138>
3. Альберт А., Сержент Е. Константы ионизации кислот и оснований М.: Химия, 1964. - 178 с.
4. Чеботарьов О.М., Єфімова І.С., Борисюк Н.А., Снігур Д.В. Метод кольорометрії в дослідженні кислотно-основних характеристик барвників рослинного походження. // Методы и объекты химического анализа. – 2011. – Т. 6. – С. 207–213.
5. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smeє D.F., Barnard D.L. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor // *Antiviral Res.* – 2013. – Vol. 100, N 2. – P. 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>

6. *Державна Фармакопея України: в 3 т. / Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів»*. – 2-е вид. - Доповнення 4. – Харків: Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2020. – С. 123-236.
7. *Россоти Ф., Россоти Х.* Определение констант устойчивости и других констант равновесия в растворах. – М. Мир, 1965. – 564 с.
8. *Бьеррум Я.* Образование аминов металлов в водном растворе, М.: Изд-во ИЛ, 1961. – 308 с.
9. *Хартли Ф., Бёргес К., Оллок Р.* Равновесия в растворах, М.: Мир, 1983. – 360 с.

Стаття надійшла до редакції 25.04.2023

**Yu. V. Scrypnets¹, G. O. Fedosenko², G. V. Maltsev², I. I. Chebotars'ka¹,
D. I. Aleksandrova¹, S. N. Kashutsky², A. V. Yegorova¹**

¹A.V. Bogatsky Physico-Chemical Institute of the National Academy of Sciences of Ukraine,
Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

²"INTERCHEM", Lustdorskaya doroga, 86, Odessa, 65080, Ukraine

DETERMINATION OF THE IONIZATION CONSTANT OF FAVIPIRAVIR API

One of the aspects of studying the physical and chemical properties of compounds is the establishment of their ionization constants. These indicators are extremely important from both a theoretical and a practical point of view.

Theoretical analysis of proteolytic equilibria and potentiometric titration of an aqueous solution of an oral antiviral drug approved for the treatment of influenza in Japan, AFI favipiravir, were carried out in the paper.

The presence of a hydroxy group in the third position of the pyrazine cycle in the molecule determines the ability of favipiravir to exhibit acid-base properties. According to acid-base titration, the ionization constant of Favipiravir API was determined: $pK_a = 5.05 \pm 0.02$. On the basis of the found pK value, the degree of formation of protolytic forms was calculated depending on the pH of the solution. It was established that favipiravir API in solutions exists in two protonated (non-ionized), tautomeric forms A_1H and A_2H and one deprotonated (ionized) form A^- .

Based on the calculations, the following conclusions can be drawn:

- at a pH value of the solution from 0 to 3.5, approximately 100% of the substance will be in two protonated (non-ionized), tautomeric forms A_1H and A_2H ;
- at pH = 5, approximately 50% of the substance will be in two protonated (non-ionized), tautomeric forms, A_1H and A_2H ;
- at a pH value > 6.5, approximately 100% of the substance will be in one deprotonated (ionized) form of A^- .

This is confirmed by the nature of the electronic absorption spectra of aqueous solutions of favipiravir. In the spectrum of favipiravir in a 0.1 M hydrochloric acid solution, there are two bands at the wavelengths of 322 nm and 365 nm, which correspond to the two tautomeric forms A_1H and A_2H . In the spectrum of favipiravir in 0.1 M sodium hydroxide solution, there is one band at a wavelength of 364 nm, which corresponds to one ionized form of A^- .

At the stage of pharmaceutical development, these data on the acid-base properties of the Favipiravir API can be used in the development of production technology, the creation of quality control methods and their validation, as well as in the study of the solubility of the API and the dissolution profiles of the finished medicinal product.

Keywords: favipiravir, potentiometric titration, ionization constant, protolytic formation function

REFERENCES

1. Salionov V.O., Avramenko A.I., Kaplaushenko A.G., Panasenko O.I., Knish E.G. *Viznachennya konstant ionizacii solej, pohidnih 2-(4-R-5(tiofen-2-il)-1,2,4-triazol-3-iltio)acetatnih kislot*. *Farmaceutichnij zhurnal*, 2014, no. 1, pp. 74-80. (in Russian)
2. Zevatskii Yu.E., Samoilo D.V., Mchedlov-Petrosyan N.O. *Contemporary methods for the experimental determination of dissociation constants of organic acids in solutions*. *Russ. J. Gen. Chem.*, 2009, Vol. 79, no 9, pp. 1859–1889. <https://doi.org/10.1134/S1070363209090138>
3. Al'bert A., Serzhent E. *Konstanty ionizacii kislot i osnovanij*. M.: Himiya, 1964, 178 p. (in Russian)
4. Chebotar'ov O.M., Efimova I.S., Borisjuk N.A., Snigur D.V. *Metod kol'orometrii v doslidzhenni kislotno-osnovnih harakteristik barvnikiv roslinnogo pohodzhennya*. *Metody i ob'ekty himicheskogo analiza*, 2011, no. 6, pp. 207–213. (in Russian)
5. Furuta Y., Gowen B.B., Takahashi K., Shiraki K., Smee D.F., Barnard D.L. *Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor*. *Antiviral Res.*, 2013, no 100, pp. 446-454. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.09.015>
6. *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, pp. 123 -236. (in Ukrainian)
7. Rossoti F., Rossoti H. *Opredelenie konstant ustojchivosti i drugih konstant ravnovesiya v rastvorah*. Moscow, Mir, 1965, 564 pp. (in Russian)
8. B'errum Y.A. *Obrazovanie amminov metallov v vodnom rastvore*. Moscow, Izd-vo IL, 1961, 308 s. (in Russian)
9. Hartli F., Byorges K., Olkok R. *Ravnovesiya v rastvorah*. Moscow, Mir, 1983, 360 p. (in Russian)