

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>
УДК 615.074; 615.322



Оригинальная статья/Research article

Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме

Е. В. Игнатьева^{1*}, И. В. Ярцева¹, З. С. Шпрах^{1,2}, И. Р. Просалкова¹, С. А. Сасов¹, О. Л. Орлова¹

1 – ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Минздрава России (НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина), 115478, Россия, г. Москва, Каширское шоссе, д. 24

2 – ФАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

*Контактное лицо: Игнатьева Елена Владимировна. E-mail: chem_analysis@ronc.ru

ORCID: Е. В. Игнатьева – <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>; И. В. Ярцева – <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>; З. С. Шпрах – <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>; И. Р. Просалкова – <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>; С. А. Сасов – <https://orcid.org/0000-0002-9679-6263>; О. Л. Орлова – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Статья поступила: 09.06.2020. Статья принята в печать: 07.09.2020. Статья опубликована: 24.11.2020

Резюме

Введение. Количественное определение действующего вещества является необходимой и едва ли не самой значимой частью контроля качества лекарственного средства. Выполнение высоких требований, предъявляемых к аналитическим методикам количественного определения, гарантирует валидация используемых методик. Представленная работа посвящена разработке и валидации методики количественного определения действующего вещества методом спектрофотометрии в лекарственной форме отечественного противоопухолевого и антиангиогенного лекарственного средства «Димерный макроциклический танин (ДМТ) лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Цель. Разработка и валидация методики количественного определения основного вещества для стандартизации препарата «ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг».

Материалы и методы. В работе использованы «ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг» и ДМТ, активная фармацевтическая субстанция. Метод исследования: спектрофотометрия.

Результаты и обсуждение. Разработана методика количественного определения действующего вещества в лиофилизированной лекарственной форме ДМТ методом прямой УФ-спектрофотометрии. Определены валидационные характеристики разработанной методики.

Заключение. Результаты валидации показали, что методика количественного определения ДМТ в лекарственной форме обеспечена приемлемой правильностью, прецизионностью и линейностью. Полученные результаты соответствуют принятым критериям, что позволяет использовать разработанную методику для оценки качества лекарственного средства.

Ключевые слова: димерный макроциклический танин (ДМТ), стандартизация, количественный анализ, валидация.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Вклад авторов. Все авторы принимали активное участие в разработке эксперимента, анализе полученных данных, написании текста статьи и ее обсуждении.

Для цитирования: Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Шпрах З. С., Просалкова И. Р., Сасов С. А., Орлова О. Л. Разработка и валидация методики количественного определения димерного макроциклического танина в лекарственной форме. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(4):15–20. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>

Development and Validation of Dimeric Macrocylic Tannin Assay Method in Dosage Forms

Elena V. Ignateva^{1*}, Irina V. Yartseva¹, Zoya S. Shprakh^{1,2}, Irina R. Prosalkova¹, Sergei A. Sasov¹, Olga V. Orlova¹

1 – Federal State Budgetary Institution «N. N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Health of the Russian Federation (N. N. Blokhin NMRCO), 24, Kashirskoye sh., 115478, Moscow, Russia

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

*Corresponding author: Elena V. Ignateva. E-mail: chem_analysis@ronc.ru

ORCID: Elena V. Ignateva – <https://orcid.org/0000-0002-9200-4492>; Irina V. Yartseva – <https://orcid.org/0000-0002-8818-7812>; Zoya S. Shprakh – <https://orcid.org/0000-0003-3034-750X>; Irina R. Prosalkova – <https://orcid.org/0000-0001-8367-7284>; Sergei A. Sasov – <https://orcid.org/0000-0002-9679-6263>; Olga V. Orlova – <https://orcid.org/0000-0002-4558-0083>.

Received: 09.06.2020. Revised: 07.09.2020. Published: 24.11.2020

Abstract

Introduction. Quantitative assessment of the active substance is necessary and perhaps the most significant part of the drug quality control. Validation of the analytical methods of quantitative assessment ensures their compliance with high requirements. The present study describes the development and validation of a spectrophotometry method for the quantitative evaluation of the active substance in the drug form of the national antitumor and antiangiogenic drug «Dimeric macrocylic tannin (DMT) lyophilizate for solution for injection, 100 mg».

Aim. The development and validation of the assay method for the standardization of «DMT lyophilizate for solution for injection, 100 mg».

Materials and methods. The study used «DMT lyophilizate for solution for injection, 100 mg» and the active substance DMT. Method – spectrophotometry.

Results and discussion. The method of the quantitative assessment of the active substance in the DMT lyophilized drug by direct UV spectrophotometry was developed and the validation characteristics of the method were defined as a result of the study.

Conclusion. The validation results showed that the assay method of DMT in the drug form has the appropriate accuracy, precision and linearity. The obtained results correspond to the approved criteria that allow the use of the developed methodology for evaluating the quality of the drug.

© Игнатьева Е. В., Ярцева И. В., Шпрах З. С., Просалкова И. Р., Сасов С. А., Орлова О. Л., 2020

© Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Prosalkova I. R., Sasov S. A., Orlova O. V., 2020

Keywords: dimeric macrocyclic tannin (DMT), standardization, assay, validation.

Conflict of interest: no conflict of interest.

Contribution of the authors. All authors took an active part in the development of the experiment, analysis of the data obtained, writing the text of the article and its discussion.

For citation: Ignateva E. V., Yartseva I. V., Shprakh Z. S., Prosalkova I. R., Sasov S. A., Orlova O. V. Development and validation of dimeric macrocyclic tannin assay method in dosage forms. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2020;9(4):15–20. (In Russ.). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2020-9-4-93-98>

ВВЕДЕНИЕ

Изучение представителей класса гидролизуемых танинов в качестве потенциальных противовирусных, иммуномодулирующих и противоопухолевых средств насчитывает не одно десятилетие. Это объясняется большим разнообразием потенциальных механизмов биологической активности соединений данного класса. Среди таких механизмов – *антиангиогенное и антивазкулярное действия*, которые проявляются подавлением развития сосудистой сети опухоли и уничтожением уже сформированных опухолевых микрососудов соответственно [1–3].

В ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России из соцветий и побегов кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) (Иван-чая) выделен комплекс гидролизуемых макроциклических танинов. Основной частью этого комплекса (около 90 %) является димерный макроциклический танин (ДМТ), который в эксперименте проявил значительную противоопухолевую и антиангиогенную активность. Лекарственная форма (ЛФ) ДМТ представляет собой лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, не содержащий вспомогательных веществ [4–6].

Качество лекарственного средства обеспечивается стандартностью как активного вещества, так и лекарственных форм на их основе. Одним из наиболее важных разделов контроля качества и стандартизации лекарственного средства является количественное определение действующего вещества. К аналитическим методикам, используемых для определения этого параметра, предъявляются высокие требования: они должны отличаться высокой достоверностью, точностью и, желательным, простотой исполнения. Правильность и точность результатов методик количественного определения гарантируется их валидацией, что особенно важно для стандартизации фармацевтических препаратов [7–9].

Цель данного исследования – разработка и валидация методики количественного определения действующего вещества в лекарственной форме димерного макроциклического танина, представляющего значительный интерес в качестве антиангиогенного средства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реактивы. ДМТ, фармацевтическая субстанция (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России); ДМТ лиофилизат для приготовления раствора для инъекций 100 мг (ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина» Минздрава России).

Приборы и аппаратура. Спектрофотометр Cary-100 (Varian, США); весы аналитические Sartorius 2405 (Sartorius AG, Германия); мерная посуда 1-го класса точности.

Методика (метод спектрофотометрии)

Для приготовления *испытуемого раствора* содержимое флакона растворяли в воде очищенной, количественно переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали; 1 мл полученного раствора переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводили объем раствора до метки водой очищенной, перемешивали.

Для приготовления *раствора стандартного образца (СО)* около 100 мг (точная навеска) субстанции ДМТ растворяли в воде очищенной, переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл и готовили раствор в том же разведении, что и испытуемый раствор.

Измерение оптической плотности полученных растворов проводили относительно воды в максимуме при длине волны 265 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Содержание ДМТ (X , мг) во флаконе вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A_1 \cdot a_0 \cdot C}{A_0 \cdot 100},$$

где A_1 и A_0 – оптическая плотность испытуемого раствора и раствора СО соответственно; a_0 – навеска СО ДМТ, мг; P – содержание ДМТ в СО, %.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Макроциклические танины кипрея узколистного *Chamerion angustifolium* (L.) *Holub* принадлежат к классу эллаготаннинов, которые представляют со-

бой сложные эфиры эллаговой и родственных ей гидроксифенилкарбоновых кислот с глюкозой [3]. Ароматические циклы, входящие в состав молекулы ДМТ, ответственны за поглощение излучения в ультрафиолетовом диапазоне длин волн. Это позволяет использовать спектрофотометрию для количественного определения основного вещества в ЛФ.

Электронные спектры поглощения водных растворов субстанции и лекарственной формы ДМТ содержат максимумы поглощения при длинах волн 215 ± 2 нм, 265 ± 2 нм и их спектральные характеристики полностью совпадают (рисунки 1 и 2). В качестве аналитического выбран максимум поглощения при длине волны 265 нм, поскольку в коротковолновой области спектра сильнее проявляются искажения из-за немонохроматичности излучения [10].

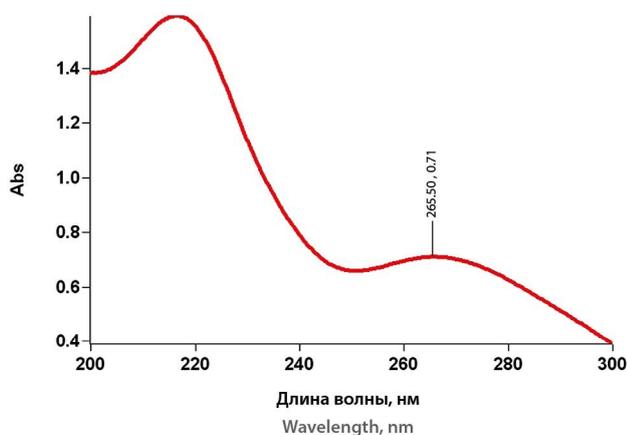


Рисунок 1. Электронный спектр поглощения водного раствора субстанции димерного макроциклического танина

Figure 1. Electronic spectrum of absorption of dimeric macrocyclic tannin substance water solution

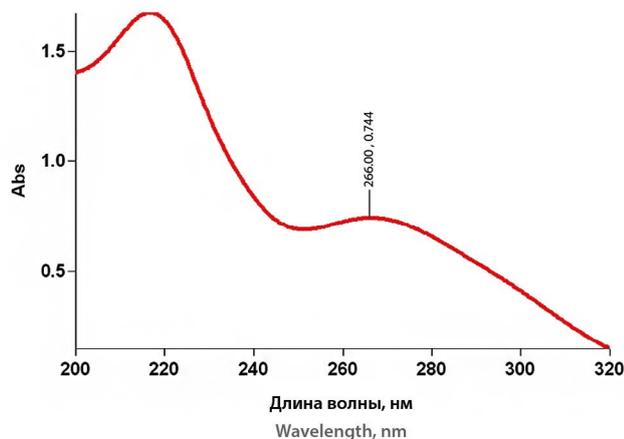


Рисунок 2. Электронный спектр поглощения водного раствора лекарственной формы димерного макроциклического танина

Figure 2. Electronic spectrum of absorption of dimeric macrocyclic tannin dosage form water solution

Интенсивность поглощения ДМТ в водных растворах в максимуме при 265 нм зависит от их концентрации, и нами было показано, что в диапазоне концентраций от 0,01 до 0,03 мг/мл эта зависимость имеет линейный характер, т. е. в данном максимуме поглощения соблюдается закон Бугера – Ламберта – Бера (рисунок 3).

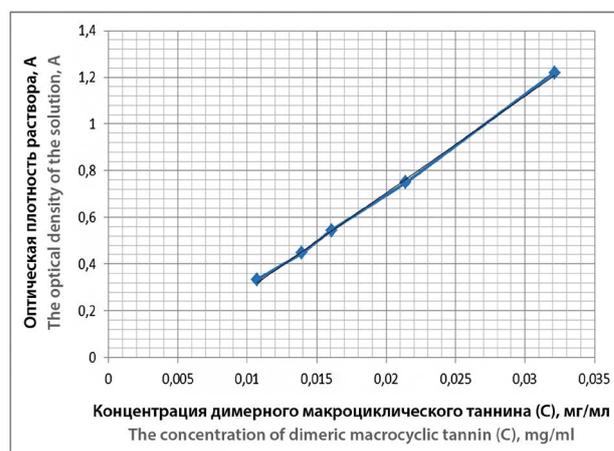


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности от концентрации водного раствора димерного макроциклического танина

Figure 3. The dependence of the optical density on the concentration of the water solution of dimeric macrocyclic tannin

Рабочей концентрацией раствора ДМТ была выбрана концентрация 0,02 мг/мл, при которой величина оптической плотности укладывается в интервал от 0,2 до 0,8, рекомендованный Государственной фармакопеей. В состав ЛФ ДМТ не входят вспомогательные вещества и, как видно из рисунков 1 и 2, спектры субстанции и ЛФ ДМТ близких концентраций совпадают, поэтому в качестве раствора сравнения при проведении анализа использована вода. Для снижения систематических и случайных ошибок при определении действующего вещества в методику введен способ расчета по стандартному образцу. В качестве СО использовали субстанцию ДМТ с точно установленным содержанием активного вещества. Разработанная методика приведена в разделе «Материалы и методы».

Поскольку предложенная методика будет использоваться для количественного определения основного вещества при стандартизации и контроле качества лекарственного средства, она подлежит валидации. В соответствии с требованиями ГФ XIV издания для подобных аналитических методик определяются следующие валидационные характеристики: *специфичность, аналитическая область (диапазон применения), линейность, правильность, прецизионность (повторяемость и промежуточная прецизионность)* [7, 11, 12].

Специфичность методики обусловлена отсутствием в ЛФ ДМТ вспомогательных веществ, которые могли бы влиять на спектральные характеристики (положение и величину аналитического сигнала), что подтверждается идентичностью ЭСП субстанции и ЛФ (см. рисунки 1 и 2).

В соответствии с требованиями ГФ XIV издания методика количественного определения должна быть применима в интервале от 80 до 120 % от номинального содержания действующего вещества в единице лекарственного средства (диапазон применения методики). В указанном интервале результаты, получаемые с использованием данной методики, имели приемлемый уровень линейности, правильности и внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности.

Линейность предложенной методики проверяли экспериментально измерением аналитического сигнала (оптической плотности) для проб с различным содержанием ДМТ в пределах аналитической области методики от 80 до 120 % от номинального содержания ДМТ во флаконе в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,024 мг/мл. На каждом уровне проводили по 3 определения и рассчитывали среднее значение оптической плотности.

Анализ полученных экспериментальных данных, приведенных в таблице 1, показывает, что рассчитанный коэффициент корреляции r равный 0,99915 отвечает необходимому условию $|r| \geq 0,99$. Это свидетельствует о наличии тесной линейной зависимости между концентрацией ДМТ и величиной оптической плотности в аналитической области методики. Результаты проведенных экспериментов хорошо описываются уравнением $y = 37,37 \cdot x - 0,005$. Подтверждением линейной зависимости исследуемых величин является графическое изображение регрессионной прямой (рисунок 4).

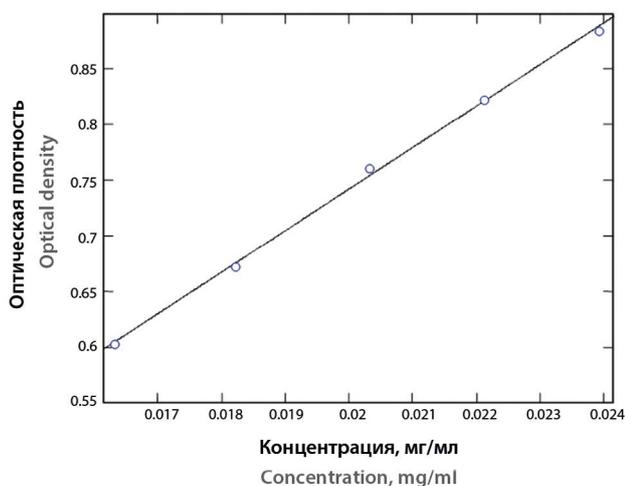


Рисунок 4. Графическое изображение регрессионной прямой

Figure 4. Graphical representation of the regression line

Таблица 1. Определение параметров линейной зависимости

Table 1. Determination of parameters of linear dependence

Процент от номинального содержания Percentage of nominal content	Концентрация ДМТ, мг/мл DMT concentration, mg/ml	Оптическая плотность Optical density	Параметры линейной зависимости $y = bx + a$ Linear dependency parameters $y = bx + a$
80 %	0,0163	0,603	Угловой коэффициент линейной зависимости $b = 37,37$ Linear slope $b = 37,37$
90 %	0,0182	0,672	Свободный член линейной зависимости $a = -0,005$ Free term of linear dependence $a = -0,005$
100 %	0,0203	0,761	Коэффициент корреляции $r = 0,99915$ Correlation coefficient $r = 0,99915$
110 %	0,0221	0,823	$y = 37,37 \cdot x - 0,005$
120 %	0,0239	0,884	

Для подтверждения правильности аналитической методики проводили анализ навесок ЛФ ДМТ в диапазоне от 80 до 120 % от номинального содержания основного действующего вещества в препарате. Приемлемыми критериями правильности спектрофотометрической методики являются величина относительной ошибки среднего результата, не превышающая 2,0 %, и отсутствие значимой систематической ошибки. На каждом уровне проводили 3 определения. Результаты анализа оценивали путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением. Данные исследования приведены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Результаты оценки правильности методики

Table 2. The results of evaluating the correctness of the methodology

№ п/п № p/p	Содержание ДМТ в анализируемой пробе ЛФ, мг DMT content in the analyzed Lf sample, mg	Найдено Found	
		мг mg	%
1	81,6	82,16	100,68
2	80,9	80,93	100,03
3	102,0	106,41	104,30
4	101,3	104,09	102,75
5	120,6	122,60	101,66
6	119,7	119,36	99,71

На основании данных, представленных в таблице 3, спектрофотометрическая методика может быть признана правильной, так как относительная ошибка среднего результата ($\bar{\varepsilon} = 1,82 \%$) не превышает 2 %; полученные результаты лежат внутри доверительного интервала среднего результата анализа ($\bar{x} \pm \Delta x$), который составил $101,52 \pm 1,85$, и приближаются к истинному значению. Численное значение коэффициента нормированных отклонений (коэффициента Стьюдента), рассчитанное по результатам анализа, составило $t = 2,12$, что ниже табличного значения коэффициента

Таблица 3. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Table 3. Metrological characteristics of the average analysis result

№	<i>m</i>	<i>f</i>	\bar{X} , %	S^2	<i>S</i>	$S_{\bar{x}}$	S_r , %	<i>P</i> , %	$t(p, f)$ табл. $t(p, f)$ tab.	$t(p, f)$ выч. $t(p, f)$ calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
1	6	5	101,52	3,09254	1,75856	0,71793	0,71	95	2,57	2,12	1,85	1,82

ента Стьюдента, который при степени свободы $f = 5$ и доверительной вероятности 95 % равен 2,57, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Таким образом, результаты, полученные данным методом, являются правильными и не отягощены систематической ошибкой.

Прецизионность методики характеризуется рассеянием результатов, получаемых с ее использованием, относительно значения среднего результата. Прецизионность исследовали на однородных образцах как повторяемость (сходимость) и промежуточную (внутрилабораторная) прецизионность.

Сходимость методики оценивали по результатам анализов образцов в двух сериях, отличающихся временем выпуска. Измерения проводили в одинаковых условиях с использованием одного и того же прибора, одним и тем же исследователем, в короткий промежуток времени. Для двух серий выполнено по 6 параллельных определений и проведена статистическая обработка полученных результатов. Результаты представлены в таблицах 4 и 5.

Таблица 4. Результаты оценки сходимости методики

Table 4. The results of the convergence assessment of the methodology

№ п/п № p/p	Найдено во флаконе, мг Found in vial, mg	
	Серия 1 Series 1	Серия 2 Series 2
1	100,17	107,31
2	101,79	107,56
3	103,30	108,94
4	101,92	106,68
5	102,67	109,69
6	102,93	107,94

Среднее значение содержания ДМТ (\bar{x} , мг) в сериях 1 и 2 лекарственной формы равно 102,13 мг и 108,02 мг соответственно. При сравнении табличного значения коэффициента Стьюдента $t_{\text{табл.}}$ (95 %, 5) = 2,57 и рассчитанных $t(p, f) = 2,47$ и 2,25 по результатам анализа двух выборок обнаружено, что $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Отно-

сительное стандартное отклонение измеряемой величины (S_r) составляет для серии 1 – 0,45 %; для серии 2 – 0,35 %.

При исследовании внутрилабораторной прецизионности анализ производили два сотрудника в разные дни. Результаты исследования приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6. Результаты оценки промежуточной прецизионности

Table 6. The results of evaluating the intermediate precision

Серия ЛФ Dosage Form Series	№ п/п № p/p	Найдено ДМТ во флаконе, мг Found DMT in a vial, mg	
		Исследователь 1 Explorer 1	Исследователь 2 Explorer 2
Серия 1 Series 1	1	100,17	103,30
	2	101,79	104,81
	3	103,30	101,29
	4	101,92	102,67
	5	102,67	101,67
	6	102,93	100,54

При сравнении результатов, полученных двумя сотрудниками, видно, что различия между средними значениями результатов 1-го и 2-го исследователей незначительны. Численное значение коэффициента Стьюдента, рассчитанное по результатам анализа двух выборок, составило $t(p, f) = 2,47$ и 2,19. Табличное значение коэффициента Стьюдента – $t_{\text{табл.}}$ (95 %, 5) = 2,57, т. е. $t_{\text{выч.}} < t_{\text{табл.}}$. Относительное стандартное отклонение измеряемой величины (S_r) составляет для 1 исследователя – 0,45 %; для 2 исследователя – 0,62 %. Таким образом, показано, что рассеяние результатов, получаемых с использованием разработанной методики относительно среднего результата, незначительно, т. е. данная методика анализа отвечает критерию прецизионности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных исследований разработана спектрофотометрическая методика количественного определения действующего вещества для

Таблица 5. Метрологические характеристики среднего результата анализа

Table 5. Metrological characteristics of the average analysis result

№ серии No. Series	<i>m</i>	<i>f</i>	\bar{X} , мг \bar{X} , mg	S^2	<i>S</i>	$S_{\bar{x}}$	S_r , %	<i>P</i> , %	$t(p, f)$ табл. $t(p, f)$ tab.	$t(p, f)$ выч. $t(p, f)$ calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
Серия 1 Series 1	6	5	102,13	1,20604	1,11266	0,45832	0,45	95	2,57	2,47	1,18	1,15
Серия 2 Series 2	6	5	108,02	1,23060	1,10932	0,45288	0,35	95	2,57	2,25	1,16	1,08

Таблица 7. Метрологические характеристики среднего результата

Table 7. Metrological characteristics of the average result

Исследователь Researcher	m	f	\bar{X} , мг \bar{X} , mg	S ²	S	S _{x̄}	S _r , %	P, %	t(p, f) табл. t(p, f) tab.	t(p, f) выч. t(p, f) calc.	Δx	$\bar{\epsilon}$, %
1	6	5	102,13	1,20604	1,11266	0,45832	0,45	95	2,57	2,47	1,18	1,15
2	6	5	102,38	2,38264	1,54358	0,63016	0,62	95	2,57	2,19	1,62	1,58

контроля содержания ДМТ в единице ЛФ. Валидация подтвердила линейную зависимость величины аналитического сигнала от концентрации изучаемого вещества в растворе, а также показала, что данная методика в исследованном аналитическом диапазоне от 80 до 120 % от номинального содержания основного действующего вещества в единице ЛФ обеспечена приемлемой правильностью и прецизионностью. Полученные результаты соответствуют критериям, рекомендуемым Государственной фармакопеей, и не отягощены систематической ошибкой. Использование данной методики позволяет достоверно установить содержание комплекса гидролизуемых танинов в лекарственной форме и корректно контролировать качество лиофилизированного препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Соломко Э. Ш., Степанова Е. В., Абрамов М. Е., Барышников А. Ю., Личиницер М. Р. Ингибиторы ангиогенеза растительного происхождения: перспективы использования в клинической онкологии. *Российский биотерапевтический журнал*. 2010;9(4):3–10.
2. Соломко Э. Ш., Степанова Е. В., Григорьева И. Н., Барышников А. Ю. Оценка антиангиогенной активности экстрактов растений и их фракций, произрастающих на территории России. *Российский биотерапевтический журнал*. 2009;8(2):56.
3. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Ярцева И. В., Толкачев О. Н. Макроциклические танины кипрея узколистного. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2010;10;24–29.
4. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Алиева Т. А., Бедрина Е. Н., Толкачев О. Н., Мисюрин В. А., Кесаева Л. А., Финашутина Ю. П., Лыжко Н. А., Мисюрин А. В., Масляков В. Ю., Фадеев Н. Б. Гидролизуемые галлоэллаго-танины кипрея узколистного (*Chamaenerion angustifolium* (L.)) из биоколлекции питомника ботанического сада фгбну вилар – перспективный источник для получения цитотоксических средств. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;1:28–34. DOI: 10.29296/25877313-2019-01-04.
5. Сасов С. А., Толкачев В. Н., Решетникова В. В., Личиницер М. Р., Степанова Е. В., Хоченков Д. А., Оборотова Н. А., Орлова О. Л., Игнатъева Е. В., Ярцева И. В. Антиангиогенное лекарственное средство. Патент РФ № 2634253; 2017.10.24.
6. Шпрах З. С., Игнатъева Е. В., Ярцева И. В., Сасов С. А., Орлова О. Л., Полозкова А. П., Хоченков Д. А., Королев А. М., Малютин Н. М. Стандартизация лиофилизированной лекарственной формы димерного макроциклического танина. *Российский биотерапевтический журнал*. 2017;16(4):68–72. DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73.
7. Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания. ОФС.1.1.0012.15; ОФС.1.1.0013.15. Т. 1. М.: ФЭМБ. 2018. 1814 с.
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Доступно по: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
9. Береговых В. В., Ишмухаметов А. А., Пятигорская Н. В., Алдышева Ж. И. Валидация в производстве лекарственных средств. М.: Ремедиум. 2019. 328 с.
10. Булатов М. И., Калинин И. П. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа. 5-е изд. Л.: Химия. 1986. 432 с.

11. Шпрах З. С., Игнатъева Е. В., Ярцева И. В. Разработка и валидация методики количественного определения аранозы в лекарственной форме. *Российский биотерапевтический журнал*. 2018;17(2):57–62. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62.
12. Шпрах З. С., Игнатъева Е. В., Ярцева И. В., Дмитричева Н. А., Смирнова Л. И. Разработка и валидация методики количественного определения цифетрилина в таблетках. *Российский биотерапевтический журнал*. 2016;15(3):55–61. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61.

REFERENCES

1. Solomko E. Sh., Stepanova E. V., Abramov M. E., Baryshnikov A. Yu., Lichinitser M. R. Angiogenesis inhibitors from plants origin: perspective for clinical usage. *Rossisky bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2010;9(4):3–10. (In Russ.).
2. Solomko E. Sh., Stepanova E. V., Grigorieva I. N., Baryshnikov A. Yu. Evaluation of the antiangiogenic activity of herbal extracts and fractions of plants growing in Russia. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2009;8(2):56. (In Russ.).
3. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Yartseva I. V., Tolkachev O. N. Macrocyclic tannins of chamaenerion angustifolium. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2010;10;24–29 (In Russ.).
4. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Totoeva N. N., Alieva I. A., Bedrina E. N., Tolkachev O. N., Misyurin V. A., Kesaeva L. A., Finashutina Yu. P., Lyzhko N. A., Misyurin A. V., Maslyakov V. Yu., Fadeev N. B. Hydrolyzable gallo-ellago-tannins of *Chamaenerion angustifolium* (L.) of the biocollection of the Vilar State University Botanical garden are a promising source for cytotoxic agents. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmaceuticheskoy himii = Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2019;1:28–34. (In Russ.). DOI: 10.29296/25877313-2019-01-04.
5. Sasov S. A., Tolkachev V. N., Reshetnikova V. V., Lichinitser M. R., Stepanova E. V., Hochenkov D. A., Oborotova N. A., Orlova O. L., Ignateva E. V., Yartseva I. V. Anti-angiogenic drug. Patent RF on the invention № 2634253; 2017.10.24. (In Russ.).
6. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V., Sasov S. A., Orlov O. V., Polozkova A. P., Hochenkov D. A., Korolev A. M., Malutina N. M. Standardization of lyophilized dosage form of dimeric macrocyclic tannin. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2017;16(4):68–72. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-4-67-73.
7. State Pharmacopeia of the Russian Federation XIV edition. OFS.1.1.0012.15; OFS.1.1.0013.15. Moscow: FEMB. 2018. 1814 p. (In Russ.).
8. ICH Harmonized Tripartite Guideline. Validation of analytical procedures: text and methodology. Q2(R1). Available at: <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/article/quality-guide-lines.html>.
9. Beregovykh V. V., Ishmukhametov A. A., Pyatigorskaya N. V., Aladysheva Zh. I. Validation in the drug manufacturing. Moscow: Remedium. 2019. 328 p. (In Russ.).
10. Bulatov M. I., Kalinkin I. P. Practical Guide of photometric analysis methods. 5th ed. Leningrad: Chemistry. 1986. 432 p. (In Russ.).
11. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V. Development and validation of aranos assay in the dosage form. *Rossisky bioterapevtichesky zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2018;17(2):57–62. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-57-62.
12. Shprakh Z. S., Ignateva E. V., Yartseva I. V., Dmitricheva N. A., Smirnova L. I. Development and validation of cyphetrylin assay in tablets. *Rossisky Bioterapevtichesky Zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*. 2016; 15(3):55–61. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-55-61.