

Научная статья

УДК 619—615.33

DOI: 10.17238/issn2541-8203.2024.1.53

## ИЗУЧЕНИЕ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ПРЕПАРАТОВ АМОКСИТРОН ЖЕВАТЕЛЬНЫЕ ТАБЛЕТКИ И СИНУЛОКС ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СОБАКАМ

Сергей Владимирович Енгатев\*, Александр Анатольевич Комаров\*\*✉,  
Александр Борисович Муромцев\*\*\*, Денис Дмитриевич Новиков\*\*\*\*,  
Алексей Викторович Мироненко\*\*\*\*, Елизавета Николаевна Гончарова\*\*\*\*,  
Диана Эльмировна Габидуллина\*\*\*\*\*

\*Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии —  
МВА имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

\*\*Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ), Москва, Россия

\*\*\*Калининградский государственный технический университе, Калининград, Россия

\*\*\*\*НВЦ Агроветзащита, Москва, Россия

\*\*\*\*\*Академия инноваций, Москва, Россия, akomarov1965@gmail.com✉

**Аннотация.** Проведено исследование по изучению биоэквивалентности препаратов «Амокситрон жевательные таблетки» (исследуемый препарат) и «Синулокс» (референтный препарат). Было сформировано 2 группы животных по 6 собак в каждой. Для опыта использовался перекрестный дизайн исследования. Отбор биологического материала (кровь) проводили до введения препаратов и через 15, 30, 45 мин, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 ч после введения препаратов. В процессе исследования контролировали концентрации действующего вещества препаратов в плазме крови собак.

После перорального введения лекарственного препарата собакам, амоксициллин и клавулановая кислота выявлены в плазме уже через 15—30 мин после введения. Показатели амоксициллина:  $T_{max}$  в среднем составил 2,1 ч как для исследуемого препарата так и для референтного препарата,  $C_{max}$  составила  $7751,5 \pm 1169,3$  нг/мл для исследуемого препарата и  $7775,7 \pm 1325,2$  нг/мл для референтного препарата. Среднее значение периода полувыведения амоксициллина из плазмы крови составило  $2,5 \pm 1,8$  ч для исследуемого препарата и  $2,9 \pm 1,8$  ч для референтного препарата. Показатели клавулановой кислоты:  $T_{max}$  в среднем составил 1,6 ч для исследуемого препарата и 1,7 ч для референтного препарата.  $C_{max}$  составила  $1298,2 \pm 381,4$  нг/мл для исследуемого препарата и  $1264, \pm 316,0$  нг/мл для референтного препарата. Среднее значение периода полувыведения клавулановой кислоты из плазмы крови составило  $0,69 \pm 0,07$  ч для исследуемого препарата и  $0,61 \pm 0,10$  ч для референтного препарата.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что 90 % доверительные интервалы соотношений  $C_{maxT}/C_{maxR}$  и  $AUC_T/AUC_R$  амоксициллина и клавулановой кислоты находятся в пределах диапазона 80—125 %, следовательно, препараты «Амокситрон жевательные таблетки» и «Синулокс» являются биоэквивалентными по действующим веществам.

**Ключевые слова:** Амокситрон жевательные таблетки, амоксициллин, клавулановая кислота, Синулокс, биоэквивалентность.

### ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

СКО — среднее квадратическое отклонение;

ОСКО — относительное среднее квадратическое отклонение;

ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВЭЖХ—МС/МС — высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием;

ДВ — действующее вещество;

© Енгатев С. В., Комаров А. А., Муромцев А. Б., Новиков Д. Д., Мироненко А. В., Гончарова Е. Н., Габидуллина Д. Э., 2024

$t_{1/2\beta}$  — период полувыведения;

$t_{\max}$  — время достижения  $C_{\max}$ ;

$C_{\max}$  — максимальная плазменная концентрация;

$AUC_{(0-t)}$  — площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$ ;

$AUC_{0-\infty}$  — площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности

Одним из важных достижений современной медицины является возможность применения противомикробных препаратов. Антибиотики — это этиотропные средства, подавляющие микроорганизмы. Использование антибиотиков в лечебных схемах для животных способствует достижению врачебных целей, увеличивается продуктивность животных, в результате растут экономические показатели в секторе животноводства, и обеспечивается пищевая безопасность всего государства [1—3].

В терапии мелких домашних и сельскохозяйственных животных антибиотики применяются в амбулаторной практике многих областей медицины при любых инфекционных процессах, вызванных антибиотик-чувствительными микроорганизмами [3—4].

В настоящее время особенно остро обсуждается вопрос резистентности микроорганизмов, вырабатывающейся к антибактериальным препаратам. Поэтому от фармацевтической промышленности ожидается выпуск эффективных препаратов с новыми комбинациями действующих веществ [3—5].

В исследовании использовались препараты: Амокситрон жевательные таблетки (Amoxutron chewable tablets) разработанные ООО «НВЦ Агроветзащита», Россия (далее — Исследуемый препарат) и Синулокс таблетки, производимый «Haupt Pharma Latina S.r.l.», Italy (далее — Референтный препарат) в дозировке действующих веществ в 1 таблетке: 400 мг амоксициллина (в форме тригидрата) и 100 мг клавулановой кислоты (в форме клавуланата калия).

Исследуемый препарат также выпускается в трех дозировках:

— «Амокситрон жевательные таблетки 50 мг» с содержанием амоксициллина 40 мг и клавулановой кислоты 10 мг в таблетке;

— «Амокситрон жевательные таблетки 250 мг» с содержанием амоксициллина 200 мг и клавулановой кислоты 50 мг в таблетке;

— «Амокситрон жевательные таблетки 500 мг» с содержанием амоксициллина 400 мг и клавулановой кислоты 100 мг в таблетке.

Амоксициллин и клавулановая кислота — действующие вещества лекарственного препа-

рата, обладают широким спектром антибактериального действия в отношении большинства грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, в том числе *Staphylococcus* spp. (включая штаммы продуцирующие  $\beta$ -лактамазу), *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Escherichia coli* (включая штаммы продуцирующие  $\beta$ -лактамазу), *Salmonella* spp. (включая штаммы продуцирующие  $\beta$ -лактамазу), *Pasteurella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Fusobacterium necrophorum*, *Campylobacter* spp.

Механизм антибактериального действия амоксициллина заключается в подавлении функциональной активности бактериальных ферментов транспептидаз, участвующих в связывании основного компонента клеточной стенки микроорганизмов — пептидогликана, что приводит к нарушению осмотического баланса, разрушению и гибели бактериальной клетки.

Амоксициллин является лекарственным средством первого выбора, применяемым при появлении симптомов заболевания на основании предварительного диагноза [6—8].

Цель исследования: изучение биоэквивалентности препарата Амокситрон жевательные таблетки и препарата Синулокс при применении собакам.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования выполнялись согласно Приказу Министерства сельского хозяйства РФ от 6 марта 2018 г. N101 «Об утверждении правил проведения доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения, клинического исследования лекарственного препарата для ветеринарного применения, исследования биоэквивалентности лекарственного препарата для ветеринарного применения».

Исследование проводилось на базе: ООО «МИП «Академия инноваций» (г. Москва), ООО «Калининградский областной центр ветеринарной медицины», ООО «АВЗ С-П» (Московская обл. г. Сергиев Посад).

Изучение биоэквивалентности препаратов проводилось на собаках стандартными методами. Собаки не получали никаких лекарственных

препаратов в течение 30 суток до начала эксперимента. Группы формировали по принципу аналогов (табл. 1).

Таблица 1

Схема опыта

	Группа 1 (6 животных)	Группа 2 (6 животных)
Период 1, 48 ч	Введение препарата Амокситрон жевательные таблетки однократно, перорально, отбор проб в промежутке 0—48 ч	Введение препарата Синулокс, однократно, перорально, отбор проб в промежутке 0—48 ч
Период отмывки, 72 ч		
Период 2, 48 ч	Введение препарата Синулокс, однократно, перорально, отбор проб в промежутке 0—48 ч	Введение препарата Амокситрон жевательные таблетки однократно, перорально, отбор проб в промежутке 0—48 ч

Отбор биологического материала (кровь) проводили до введения препаратов, и через 15, 30, 45 мин, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 ч после введения препаратов.

В процессе исследования контролировали концентрации действующего вещества препаратов в плазме крови собак.

Образцы крови отбирали в количестве не менее 4 мл в пробирки с гепарином, центрифугировали при 3000—3500 об/мин и 4 °С в течение 15 мин, отделяли плазму во вторичные (транспортные) криопробирки, маркировали и замораживали в жидком азоте.

Для определения амоксициллина и клавулановой кислоты использовали ВЭЖХ—МС/МС, ввиду его универсальности, селективности и чувствительности. При пробоподготовке образцов для определения амоксициллина использовали методику, прошедшую валидацию в соответствии с требованиями международных документов по валидации [9, 10] и ранее описанную в [11]. Для определения клавулановой кислоты была разработана и валидирована [9, 10] методика на основе описанного ранее метода [12].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ПО Microsoft Excel 2013, ПО PKSolver, ПО Statistica.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка фармакокинетики амоксициллина и клавулановой кислоты. Амоксициллин, и клавулановая кислота принадлежат к классу β-лактамовых антибиотиков, которые обычно комбинируют

друг с другом для лечения инфекций у домашних животных. Эта комбинация может инактивировать широкий спектр β-лактамаз, улучшать бактерицидную активность и расширять антимикробный спектр.

Графическое изображение усредненных фармакокинетических профилей представлено на рисунке 1.

После перорального введения лекарственного препарата собакам амоксициллин сравнительно быстро всасывается в системный кровоток: амоксициллин выявлен в плазме уже через 15—30 мин после введения, показатель  $T_{max}$  в среднем составил 2,1 ч как для исследуемого препарата так и для референтного препарата.  $C_{max}$  составила  $7751,5 \pm 1169,3$  нг/мл для исследуемого препарата и  $7775,7 \pm 1325,2$  нг/мл для референтного препарата. Среднее значение периода полувыведения амоксициллина из плазмы крови составило  $2,5 \pm 1,8$  ч для исследуемого препарата и  $2,9 \pm 1,8$  ч для референтного препарата.

В таблицах 2 и 3 приведены значения фармакокинетических параметров для референтного и исследуемого препаратов.

После перорального введения лекарственного препарата собакам клавулановая кислота быстро всасывается в системный кровоток: клавулановая кислота выявлена в плазме уже через 15—30 мин после введения, показатель  $T_{max}$  в среднем составил 1,6 ч для исследуемого препарата и 1,7 ч для референтного препарата.  $C_{max}$  составила  $1298,2 \pm 381,4$  нг/мл для исследуемого препарата и  $1264, \pm 316,0$  нг/мл для референтного препарата. Среднее значение периода полувыведения

ведения клавулановой кислоты из плазмы крови составило  $0,69 \pm 0,07$  ч для исследуемого препарата и  $0,61 \pm 0,10$  ч для референтного препара-

та. Графические изображения усредненных фармакокинетических профилей представлены на рисунке 2.

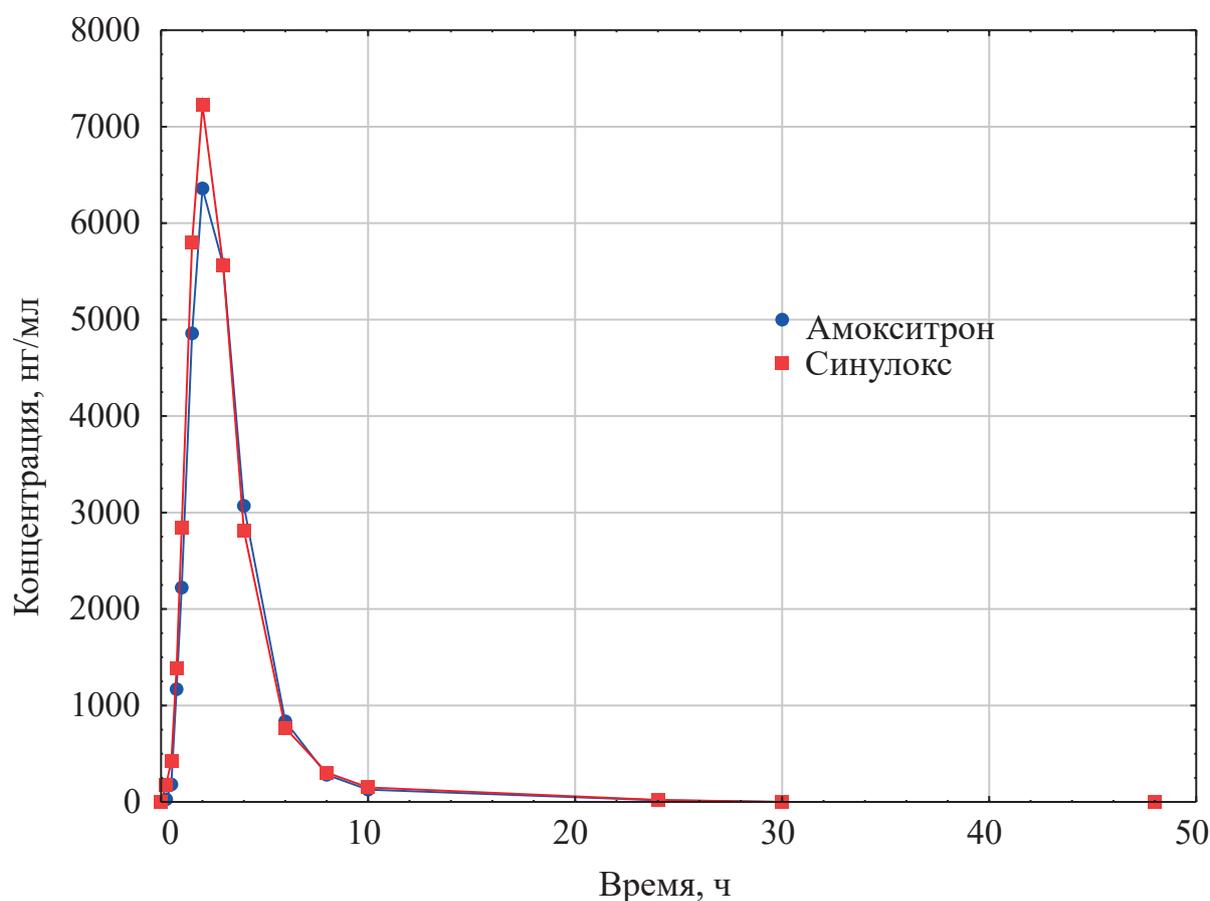


Рис. 1. Фармакокинетические профили амоксициллина после введения «Амокситрон жевательные таблетки», «Синулокс», по средним значениям ( $n = 12$ )

Таблица 2

Индивидуальные и усредненные значения фармакокинетических параметров амоксициллина у собак при введении Исследуемого препарата («Амокситрон жевательные таблетки»)

№ животного	Период	Послед- ствие	$C_{\max}$ (нг/мл)	$AUC_{0-t}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-t} /$ $AUC_{0-\infty}$	$T_{\max}$ (ч)	$t_{1/2\beta}$ (ч)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	I	И-Р	7 792,7	19 809,4	20 016,4	0,99	2,0	6,4
2	I	И-Р	5 599,7	16 943,6	17 054,5	0,99	2,0	1,1
3	I	И-Р	8 115,6	20 426,3	20 656,9	0,99	3,0	1,4
4	I	И-Р	7 771,5	23 998,4	24 635,8	0,97	2,0	1,6
5	I	И-Р	9 879,4	23 850,5	23 997,0	0,99	2,0	1,1
6	I	И-Р	8 757,7	25 498,7	25 562,5	1,00	1,5	4,1
7	II	Р-И	7 130,2	21 257,6	21 527,8	0,99	3,0	1,2

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9
8	II	Р-И	6 905,6	17 378,5	17 609,7	0,99	2,0	1,3
9	II	Р-И	9 088,8	30 959,0	31 487,3	0,98	3,0	1,4
10	II	Р-И	8 166,6	17 398,8	17 478,2	1,00	1,0	4,7
11	II	Р-И	6 558,2	12 442,1	12 547,0	0,99	1,5	1,7
12	II	Р-И	7 252,1	24 244,2	24 426,9	0,99	2,0	4,4
Среднее			7 751,5	21 183,9	21 416,7	0,99	2,1	2,5
СКО			1 169,3	4 901,2	4 999,5	0,01	0,6	1,8
ОСКО			15	23	23	1	30	72

Таблица 3

Индивидуальные и усредненные значения фармакокинетических параметров амоксициллина у собак при введении Референтного препарата («Синулокс»)

№ животного	Период	Послед- ствие	$C_{max}$ (нг/мл)	$AUC_{0-t}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-\infty}$ (нг/мл*ч)	$AUC_{0-t}/$ $AUC_{0-\infty}$	$T_{max}$ (ч)	$t_{1/2\beta}$ (ч)
1	II	И-Р	8 214,7	21 258,0	21 439,1	0,99	1,5	4,9
2	II	И-Р	8 219,2	25 398,1	25 470,6	1,00	3,0	3,6
3	II	И-Р	6 549,1	20 361,0	20 416,8	1,00	2,0	3,2
4	II	И-Р	6 642,4	20 432,4	21 028,6	0,97	2,0	1,6
5	II	И-Р	8 081,2	17 735,1	17 826,3	0,99	1,5	4,1
6	II	И-Р	7 746,2	24 173,6	24 616,4	0,98	2,0	1,4
7	I	Р-И	10 052,8	27 133,2	27 234,8	1,00	2,0	4,1
8	I	Р-И	7 144,7	23 765,9	24 192,0	0,98	2,0	6,5
9	I	Р-И	8 784,1	31 992,3	32 355,5	0,99	3,0	1,3
10	I	Р-И	9 595,2	20 238,3	20 406,9	0,99	1,5	1,4
11	I	Р-И	6 764,1	18 267,9	18 414,1	0,99	2,0	1,3
12	I	Р-И	5 515,2	18 497,3	18 746,1	0,99	3,0	1,3
Среднее			7 775,7	22 437,8	22 678,9	0,99	2,1	2,9
СКО			1 325,2	4 226,2	4 263,7	0,01	0,6	1,8
ОСКО			17	19	19	1	27	61

<sup>a</sup>  $T_{max}$  — время достижения максимальной концентрации в плазме,  $C_{max}$  — максимальная концентрация в плазме,  $AUC_{0-t}$  — площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема до последней определяемой концентрации во временной точке  $t$ ,  $AUC_{0-\infty}$  — площадь под кривой «плазменная концентрация–время» с момента приема лекарственного препарата до бесконечности,  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  — соотношение значений  $AUC_{0-t}$  и  $AUC_{0-\infty}$ ,  $t_{1/2\beta}$  — период полувыведения.

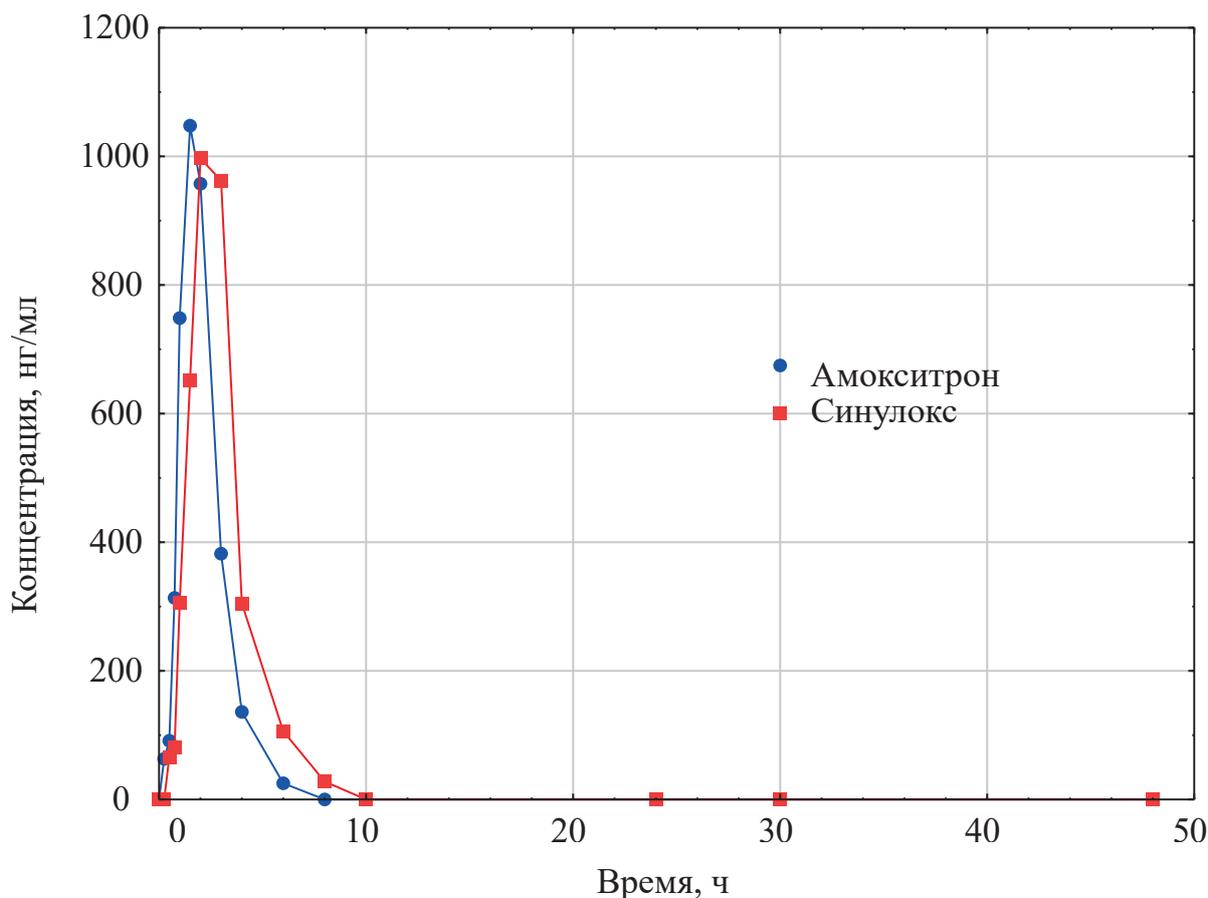


Рис. 2. Фармакокинетические профили клавулановой кислоты после введения «Амокситрон жевательные таблетки» и «Синулокс», по средним значениям ( $n = 12$ )

Минимальные ингибирующие концентрации (МИС) амоксициллина в комбинации с клавулановой кислотой против распространенных возбудителей инфекций собак находятся в диапазоне 0,047—2 мкг/мл: в том числе *Streptococcus* spp., *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *S. canis*, *Fusobacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. — 0,5 мкг/мл; *Proteus* spp., *Klebsiella* spp., *Corynebacterium* spp. — 2 мкг/мл; *S. Intermedius* — 0,047—0,25 мкг/мл [12—16], *Pasteurella* spp. — 0,25 мкг/мл, *Escherichia coli* — 0,5 мкг/мл, *Streptococcus* spp. — 0,12 мкг/мл [15—16], *Staphylococcus aureus* — 0,1—0,4 мкг/мл, *Staphylococcus pseudintermedius* — 0,12 мкг/мл, *Pasteurella multocida* — 0,06—0,5 мкг/мл [8].

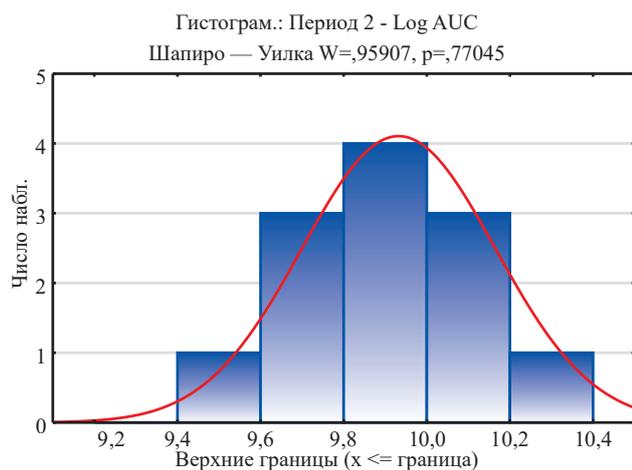
Из полученных результатов видно, что даже при однократном введении в плазме крови достигаются уровни, превышающие вышеперечисленные МИС. Концентрация амоксициллина в крови собак после перорального введения препарата превышает значения МИС этих возбудителей до 5 ч после введения препарата. Учитывая, что для исследуемого препарата предполагается интервал введения в 12 ч, это

обеспечит  $T > \text{MIC}$  не менее 42 % во время интервала между введениями препарата. Эффективность лечения антибиотиками, у которых постантибиотический эффект выражен минимально (к которым относятся бета-лактамы), достигается при  $T > \text{MIC}$  не менее 40 % [1—10].

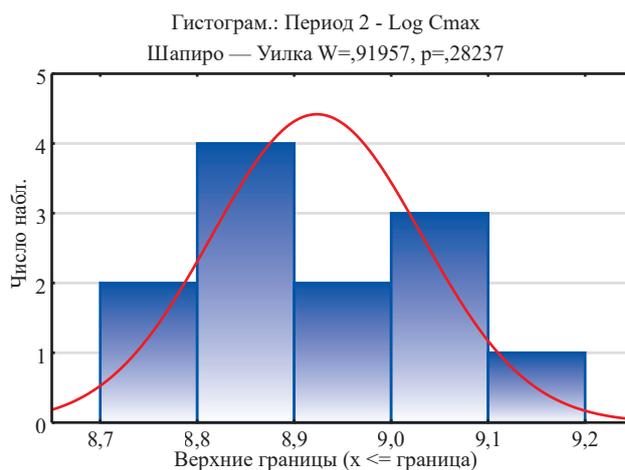
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

**Оценка биоэквивалентности.** Полученные при фармакокинетическом анализе значения  $C_{\text{max}}$  и  $AUC_{0-t}$  были подвергнуты логарифмическому преобразованию с использованием натуральных логарифмов и дальнейшим стандартным оценкам (рис. 3—6).

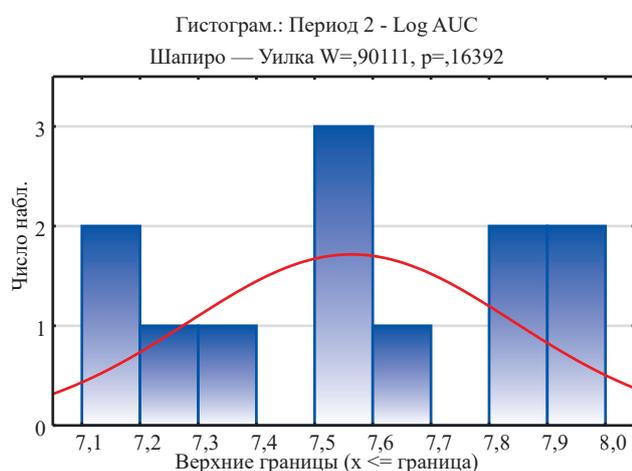
Полученные результаты свидетельствуют о том, что 90 % доверительные интервалы соотношений  $C_{\text{maxT}}/C_{\text{maxR}}$  и  $AUC_{\text{T}}/AUC_{\text{R}}$  амоксициллина и клавулановой кислоты находятся в пределах диапазона 80—125 %, следовательно, препараты Амокситрон жевательные таблетки и Синулокс являются биоэквивалентными по действующим веществам.



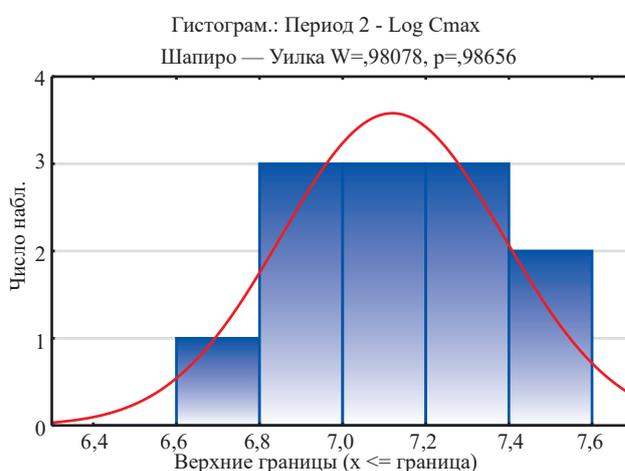
**Рис. 3.** Распределение логарифмически преобразованных значений AUC амоксициллина, период II



**Рис. 4.** Распределение логарифмически преобразованных значений C<sub>max</sub> амоксициллина, период II



**Рис. 5.** Распределение логарифмически преобразованных значений AUC клавулановой кислоты, период II



**Рис. 6.** Распределение логарифмически преобразованных значений C<sub>max</sub> клавулановой кислоты, период II

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

21. Данилевская Н. В. Сложности в применении антибиотиков при лечении мелких домашних животных/ Н.В. Данилевская, В. В. Суботин // VetPharma. — 2011. — № 3—4. — С. 49—55

22. Никанорова А. М. Дирофиляриоз плотоядных в Калужской области /А.М. Никанорова//Теория и практика борьбы с паразитарными болезнями. — 2017. — № 18. — С. 309—312

23. Симджи Ш. Рациональное применение антибиотиков в животноводстве и ветеринарии / Ш. Симджи, Р. Дул, Р. С. Козлов // КМАХ. 2016. № 3. — С. 186—190

24. Дехнич А. В. Эпидемиология антибиотикорезистентности нозокомиальных штаммов Staphylococcus aureus в России: результаты многоцентрового исследования /А. Дехнич, И. А. Эйдельштейн, А. Д. Нарезкина и др. //КМАХ. — 2002. — Т. 4. — № 4. — С. 325—36.

25. Mateus, A. Применение антибиотиков для лечения собак и кошек в ветеринарных клиниках общего профиля в Великобритании /А. Mateus, D. C. Brodbelt, N. Barber, K.D.C. Stark // JSAP Российское издание. — 2011. — № 6. — С. 6—11

26. Plumb D. C. (2011). Plumb's veterinary drug handbook. Stockholm, Wis: PharmaVet.

27. Stegemann M. R., Passmore C. A., Sherington J., Lindeman C. J., Papp G., Weigel D. J., Skogerboe T. L. Antimicrobial Activity and Spectrum of Cefovecin, a New Extended-Spectrum Cephalosporin, against Pathogens Collected from Dogs and Cats in Europe and North America. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. — 2006. — V. 50. — P. 2286—2292.

28. Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Tenth Edition. Edited by Jim E. Riviere and Mark G. Papich. 2018 JohnWiley & Sons.

29. EMA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf))

30. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London (2011) ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf))

31. Гончарова Е. Н., Габидуллина Д. Э., Селимов Р. Н., Коряковцев П. А., Карсакова Ю. В., Козлов С. В., Комаров А. А., Енгашева Е. С., Енгашев С. В., Уша Б. В., Гламаздин И. Г., Удавлиев Д. И. ВЭЖХ—МС/МС определение амоксициллина в плазме крови с использованием дериватизации // Сорбционные и хроматографические процессы. 2022. Т. 22. № 6. С. 816—828.

32. Reyns T., Baere S., Croubels S., Backer P. Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry // J. Mass Spectrom. 2006; 41: 1414—1420.

#### ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

**С. В. Енгашев** — доктор ветеринарных наук, академик РАН, профессор кафедры паразитологии и ветеринарно-санитарной экспертизы;

**А. А. Комаров** — доктор биологических наук, профессор РАН, профессор кафедры ветеринарной медицины;

**А. Б. Муромцев** — доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий кафедрой зоотехники;

**Д. Д. Новиков** — кандидат ветеринарных наук, заместитель директора по науке;

**А. В. Мироненко** — кандидат ветеринарных наук, научный сотрудник департамента науки;

**Е. Н. Гончарова** — кандидат химических наук, заведующая лабораторией;

**Д. Э. Габидуллина** — старший научный сотрудник.

Статья поступила в редакцию 14.02.2024.

Original article  
UDC 619—615.33

## STUDYING THE BIOEQUIVALENCE OF “AMOXITRON CHEWABLE TABLETS” AND “SYNULOX” WHEN ADMINISTERED TO DOGS

Sergey Vladimirovich Engashev\*, Aleksandr Anatolyevich Komarov\*\*✉,  
Aleksandr Borisovich Muromtsev\*\*\*, Denis Dmitrievich Novikov\*\*\*\*,  
Aleksey Viktorovich Mironenko\*\*\*\*, Elizaveta Nikolaevna Goncharova\*\*\*\*\*,  
Diana Elmirovna Gabidullina\*\*\*\*\*

\*Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA named after K. I. Scryabin,  
Moscow, Russia

\*\*Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

\*\*\*Kaliningrad State Technical University, Kaliningrad, Russia

\*\*\*\*RCC Agrovetzashchita, Moscow, Russia

\*\*\*\*\*Academy of Innovations, Moscow, Russia, akomarov1965@gmail.com✉

**Abstract.** A research was conducted to study the bioequivalence of the drugs “Amoxitron chewable tablets” (studied drug) and “Synulox” (reference drug). Two (2) groups of animals (6 dogs each) were formed. The experiment used a cross-sectional study design. Biological material (blood) was collected before drug administration and 15, 30, 45 minutes, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 hours after drug administration. During the study, the blood plasma concentrations of the active substance of the drugs in the dogs were monitored.

After oral administration of the drug to dogs, amoxicillin and clavulanic acid were detected in plasma within 15—30 minutes after administration. Amoxicillin indicators:  $T_{max}$  averaged 2.1 hours for both the study drug and the reference drug,  $C_{max}$  was  $7751.5 \pm 1169.3$  ng/ml for the study drug, and  $7775.7 \pm 1325.2$  ng/ml for the reference drug. The mean plasma half-life of amoxicillin was  $2.5 \pm 1.8$  hours for the study drug and  $2.9 \pm 1.8$  hours for the reference drug. Indicators of clavulanic acid:  $T_{max}$  averaged 1.6 hours for the study drug and 1.7 hours for the reference drug.  $C_{max}$  was  $1298.2 \pm 381.4$  ng/ml for the study drug and  $1264.0 \pm 316.0$  ng/ml for the reference drug. The average half-life of clavulanic acid from blood plasma was  $0.69 \pm 0.07$  hours for the study drug and  $0.61 \pm 0.10$  hours for the reference drug.

The results obtained indicate that the 90 % confidence intervals of the  $C_{maxT}/C_{maxR}$  and  $AUC_T/AUC_R$  ratios of amoxicillin and clavulanic acid are within the range of 80—125 %, therefore, the drugs “Amoxitron chewable tablets” and “Synulox” are bioequivalent in terms of active ingredients.

**Keywords:** Amoxitron chewable tablets, amoxicillin, clavulanic acid, Synulox, bioequivalence.

### LIST OF ABBREVIATIONS AND DESIGNATIONS

SD — standard deviation;

RSD — relative standard deviation;

HPLC — high performance liquid chromatography;

HPLC—MS/MS — high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection;

AS — active substance;

$t_{1/2\beta}$  — half-life;

$t_{max}$  — time to reach  $C_{max}$ ;

$C_{max}$  — maximum plasma concentration;

$AUC_{(0-t)}$  — area under the “plasma concentration-time” curve from the moment of administration to the last determined concentration at time point  $t$ ;

$AUC_{0-\infty}$  — area under the “plasma concentration-time” curve from the moment of drug administration to infinity

One of the important achievements of modern medicine is the possibility of using antimicrobial drugs. Antibiotics are etiotropic drugs that suppress microorganisms. The use of antibiotics in treatment regimens for animals contributes to the achievement of medical goals, the productivity of animals increases, as a result, economic indicators in the livestock sector increase, and food security of the entire state is ensured [1–3].

In the treatment of small domestic and farm animals, antibiotics are used in outpatient practice in many areas of medicine for any infectious processes caused by antibiotic-sensitive microorganisms [3–4].

Currently, the issue of developing resistance of microorganisms to antibacterial drugs is especially heatedly discussed. Therefore, the pharmaceutical industry is expected to produce effective drugs with new combinations of active substances [3–5].

The drugs used in the study were “Amoxytron chewable tablets” designed by “RCC Agrovetzashchita” LLC, Russia (hereinafter referred to as the study drug) and “Synulox” tablets produced by Haupt Pharma Latina S.r.l., Italy (hereinafter referred to as the reference drug) in the dosage of active ingredients in 1 tablet: 400 mg of amoxicillin (in the form of trihydrate) and 100 mg of clavulanic acid (in the form of potassium clavulanate).

The study drug is also available in three dosages.

— “Amoxitron chewable tablets 50 mg”, containing 40 mg of amoxicillin and 10 mg of clavulanic acid per tablet.

— “Amoxitron chewable tablets 250 mg”, containing 200 mg of amoxicillin and 50 mg of clavulanic acid per tablet.

— “Amoxitron chewable tablets 500 mg”, containing 400 mg of amoxicillin and 100 mg of clavulanic acid per tablet.

Amoxicillin and clavulanic acid, the active ingredients of the drug, have a wide spectrum of antibacterial action against most gram-positive and gram-neg-

ative microorganisms, including *Staphylococcus spp.* (including strains producing  $\beta$ -lactamase), *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Escherichia coli* (including strains producing  $\beta$ -lactamase), *Salmonella spp.* (including  $\beta$ -lactamase producing strains), *Pasteurella spp.*, *Klebsiella spp.*, *Proteus spp.*, *Fusobacterium necrophorum*, *Campylobacter spp.*

The mechanism of the antibacterial action of amoxicillin is to suppress the functional activity of bacterial transpeptidase enzymes involved in binding the main component of the cell wall of microorganisms — peptidoglycan, which leads to an imbalance in the osmotic balance, destruction and death of the bacterial cell.

Amoxicillin is the drug of first choice, used when symptoms of the disease appear based on a preliminary diagnosis [6–8].

**Study objective:** to study the bioequivalence of the drug “Amoxitron chewable tablets” and the drug “Synulox” when administered to dogs.

## MATERIAL AND METHODS

The studies were carried out in accordance with the Order of the Ministry of Agriculture of the Russian Federation dtd. March 6, 2018 N101 On Approval of the Rules for Conducting a Preclinical Study of a Medicinal Product for Veterinary Use, a Clinical Trial of a Medicinal Product for Veterinary Use, a Study of the Bioequivalence of a Medicinal Product for Veterinary Use.

The study was conducted on the basis of “SIE “Academy of Innovations” LLC (Moscow), “Kaliningrad Regional Center of Veterinary Medicine” LLC, “AVZ S-P” LLC (Moscow region, Sergiev Posad).

Bioequivalence studies of the drugs were carried out on dogs using standard methods. The dogs did not receive any medications for 30 days before the experiment onset. The groups were formed according to the principle of analogues (Table 1).

**Table 1**

### Design of the experiment

	Group 1 (6 animals)	Group 2 (6 animals)
Period 1, 48 h	Administration of the drug «Amoxitron chewable tablets» once, orally, sampling in the interval of 0–48 h	Administration of the drug «Synulox», once, orally, sampling in the interval of 0–48 h
Washout period, 72 h		
Period 2, 48 h	Administration of the drug «Synulox», once, orally, sampling in the interval of 0–48 h	Administration of the drug «Amoxitron chewable tablets» once, orally, sampling in the interval of 0–48 h

Biological material (blood) was collected before drug administration and 15, 30, 45 minutes, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 24, 30, 48, 72 hours after drug administration.

During the study, the blood plasma concentrations of the active substance of the drugs in dogs were monitored.

Blood samples were collected in quantities of at least 4 ml into tubes with heparin, centrifuged at 3000—3500 rpm and 4 °C for 15 minutes, plasma was separated into secondary (transport) cryotubes, labeled and frozen in liquid nitrogen.

HPLC—MS/MS was used for the determination of amoxicillin and clavulanic acid due to its versatility, selectivity and sensitivity. When preparing samples for the determination of amoxicillin, we used a method that was validated in accordance with the requirements of international validation documents [9, 10] and pre-

viously described [11]. For the determination of clavulanic acid, a procedure was developed and validated [9, 10], based on the previously described method [12].

Statistical processing of the results was carried out using the Microsoft Excel 2013 software, PKSolver software and Statistica software.

### STUDY RESULTS AND DISCUSSION

Evaluation of the pharmacokinetics of amoxicillin and clavulanic acid. Amoxicillin and clavulanic acid belong to the class of  $\beta$ -lactam antibiotics that are commonly combined with each other to treat infections in pets. This combination can inactivate a wide range of  $\beta$ -lactamases, improve bactericidal activity and expand the antimicrobial spectrum.

A graphical representation of the averaged pharmacokinetic profiles is presented in Fig. 1.

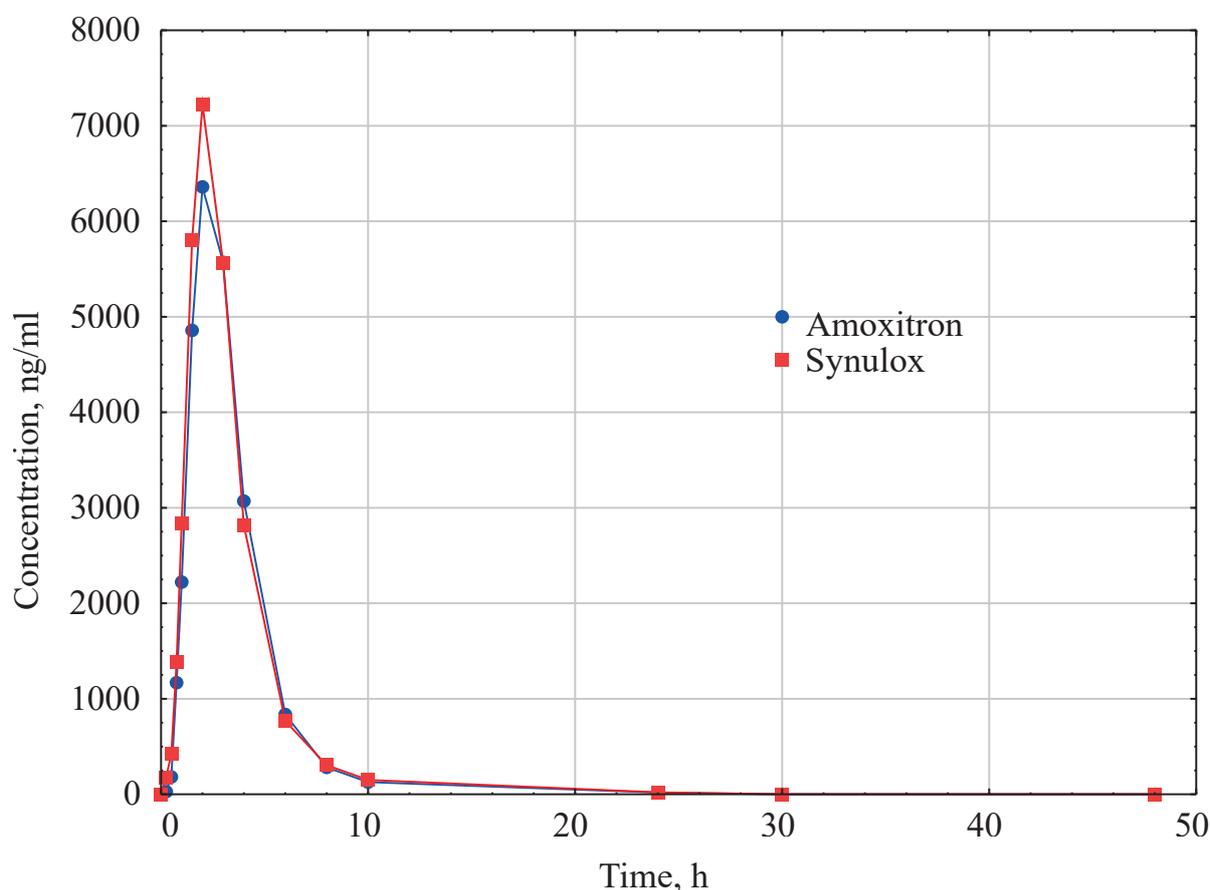


Fig. 1. Pharmacokinetic profiles of amoxicillin after administration of “Amoxitron chewable tablets”, “Synulox”, based on mean values ( $n = 12$ )

After oral administration of the drug to dogs, amoxicillin is relatively quickly absorbed into the systemic circulation: amoxicillin was detected in plasma within 15—30 minutes after administration, the  $T_{max}$  value averaged 2.1 hours for both the study drug and the

reference drug.  $C_{max}$  was  $7751.5 \pm 1169.3$  ng/ml for the study drug and  $7775.7 \pm 1325.2$  ng/ml for the reference drug. The mean plasma half-life of amoxicillin was  $2.5 \pm 1.8$  hours for the study drug and  $2.9 \pm 1.8$  hours for the reference drug.

Tables 2 and 3 show the values of pharmacokinetic parameters for the reference and study drugs.

After oral administration of the drug to dogs, clavulanic acid is quickly absorbed into the systemic circulation: clavulanic acid was detected in plasma within 15–30 minutes after administration, the  $T_{max}$  value averaged 1.6 hours for the study drug and 1.7 hours for

the reference drug.  $C_{max}$  was  $1298.2 \pm 381.4$  ng/ml for the study drug and  $1264.0 \pm 316.0$  ng/ml for the reference drug. The average half-life of clavulanic acid from blood plasma was  $0.69 \pm 0.07$  hours for the study drug and  $0.61 \pm 0.10$  hours for the reference drug. Graphic representations of averaged pharmacokinetic profiles are presented in Fig. 2.

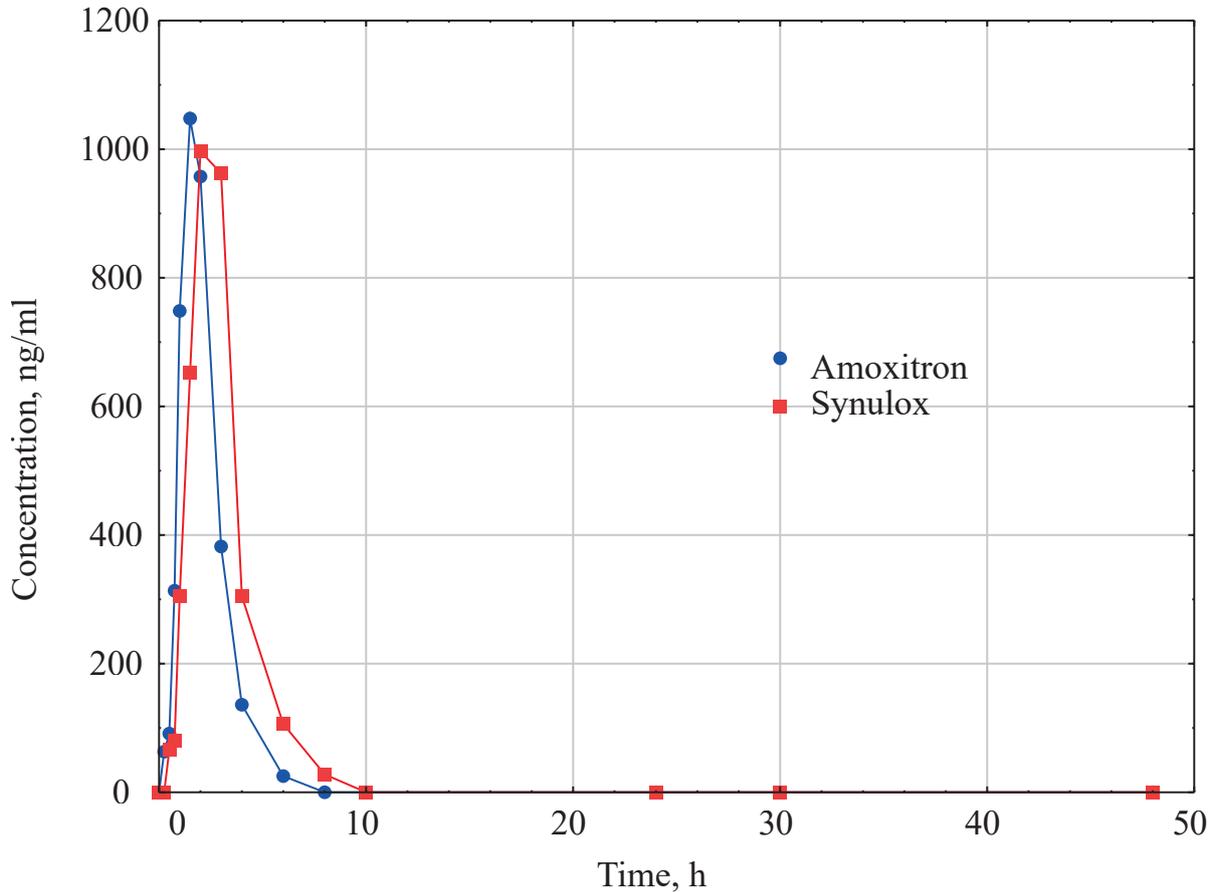


Fig. 2. Pharmacokinetic profiles of clavulanic acid after administration of “Amoxitron chewable tablets” and “Synulox”, based on mean values ( $n = 12$ )

Table 2

Individual and mean values of pharmacokinetic parameters<sup>a</sup> of amoxicillin in dogs upon administration of the study drug (“Amoxitron chewable tablets”)

No. of animal	Period	Succession	$C_{max}$ (ng/ml)	$AUC_{0-t}$ (ng/ml*h)	$AUC_{0-\infty}$ (ng/ml*h)	$AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}$	$T_{max}$ (h)	$t_{1/2\beta}$ (h)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	I	I-R	7 792.7	19 809.4	20 016.4	0.99	2.0	6.4
2	I	I-R	5 599.7	16 943.6	17 054.5	0.99	2.0	1.1
3	I	I-R	8 115.6	20 426.3	20 656.9	0.99	3.0	1.4
4	I	I-R	7 771.5	23 998.4	24 635.8	0.97	2.0	1.6
5	I	I-R	9 879.4	23 850.5	23 997.0	0.99	2.0	1.1

**Table 2 (the end)**

1	2	3	4	5	6	7	8	9
6	I	I-R	8 757.7	25 498.7	25 562.5	1.00	1.5	4.1
7	II	R-I	7 130.2	21 257.6	21 527.8	0.99	3.0	1.2
8	II	R-I	6 905.6	17 378.5	17 609.7	0.99	2.0	1.3
9	II	R-I	9 088.8	30 959.0	31 487.3	0.98	3.0	1.4
10	II	R-I	8 166.6	17 398.8	17 478.2	1.00	1.0	4.7
11	II	R-I	6 558.2	12 442.1	12 547.0	0.99	1.5	1.7
12	II	R-I	7 252.1	24 244.2	24 426.9	0.99	2.0	4.4
Mean			7 751.5	21 183.9	21 416.7	0.99	2.1	2.5
SD			1 169.3	4 901.2	4 999.5	0.01	0.6	1.8
RSD			15	23	23	1	30	72

**Table 3**

*Individual and mean values of pharmacokinetic parameters<sup>a</sup> of amoxicillin in dogs upon administration of the reference drug ("Synulox")*

No. of animal	Period	Succession	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC <sub>0-t</sub> (ng/ml*h)	AUC <sub>0-∞</sub> (ng/ml*h)	AUC <sub>0-t</sub> / AUC <sub>0-∞</sub>	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2β</sub> (h)
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	II	I-R	8 214.7	21 258.0	21 439.1	0.99	1.5	4.9
2	II	I-R	8 219.2	25 398.1	25 470.6	1.00	3.0	3.6
3	II	I-R	6 549.1	20 361.0	20 416.8	1.00	2.0	3.2
4	II	I-R	6 642.4	20 432.4	21 028.6	0.97	2.0	1.6
5	II	I-R	8 081.2	17 735.1	17 826.3	0.99	1.5	4.1
6	II	I-R	7 746.2	24 173.6	24 616.4	0.98	2.0	1.4
7	I	R-I	10 052.8	27 133.2	27 234.8	1.00	2.0	4.1
8	I	R-I	7 144.7	23 765.9	24 192.0	0.98	2.0	6.5
9	I	R-I	8 784.1	31 992.3	32 355.5	0.99	3.0	1.3
10	I	R-I	9 595.2	20 238.3	20 406.9	0.99	1.5	1.4
11	I	R-I	6 764.1	18 267.9	18 414.1	0.99	2.0	1.3
12	I	R-I	5 515.2	18 497.3	18 746.1	0.99	3.0	1.3
Mean			7 775.7	22 437.8	22 678.9	0.99	2.1	2.9
SD			1 325.2	4 226.2	4 263.7	0.01	0.6	1.8
RSD			17	19	19	1	27	61

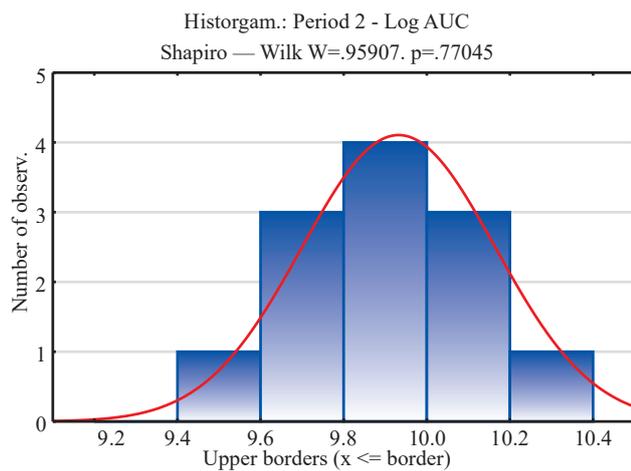
<sup>a</sup> T<sub>max</sub> is the time to reach the maximum concentration in plasma, C<sub>max</sub> is the maximum concentration in plasma, AUC<sub>0-t</sub> is the area under the "plasma concentration-time" curve from the moment of administration to the last determined concentration at time point t, AUC<sub>0-∞</sub> is the area under the "plasma concentration-time" curve from the moment of taking the drug to infinity, AUC<sub>0-t</sub>/AUC<sub>0-∞</sub> is the ratio of the values of AUC<sub>0-t</sub> and AUC<sub>0-∞</sub>, t<sub>1/2β</sub> is the half-life.

The minimum inhibitory concentrations (MIC) of amoxicillin in combination with clavulanic acid against common canine infectious agents are in the range of 0.047–2 µg/ml: including *Streptococcus spp.*, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *S. canis*, *Fusobacterium spp.*, *Peptostreptococcus spp.* — 0.5 µg/ml; *Proteus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Corynebacterium spp.* — 2 µg/ml; *S. Intermedius* — 0.047–0.25 µg/ml [12–16], *Pasteurella spp.* — 0.25 µg/ml, *Escherichia coli* — 0.5 µg/ml, *Streptococcus spp.* — 0.12 µg/ml [15–16], *Staphylococcus aureus* — 0.1–0.4 µg/ml, *Staphylococcus pseudintermedius* — 0.12 µg/ml, *Pasteurella multocida* — 0.06–0.5 µg/ml [8].

From the results obtained, it is clear that even with a single dose, plasma levels exceeding the above MIC are achieved. The blood concentration of amoxicillin in dogs after oral administration of the drug exceeds the MIC values of these pathogens up to 5 hours after the drug administration. Given that the study drug is expected to have a 12-hour dosing interval, this would provide a  $T > MIC$  of at least 42 % during the dosing interval. The effectiveness of treatment with antibiotics in which the post-antibiotic effect is minimally expressed (which includes beta-lactam antibiotics) is achieved with a  $T > MIC$  of at least 40 % [1–10].

### CONCLUSION

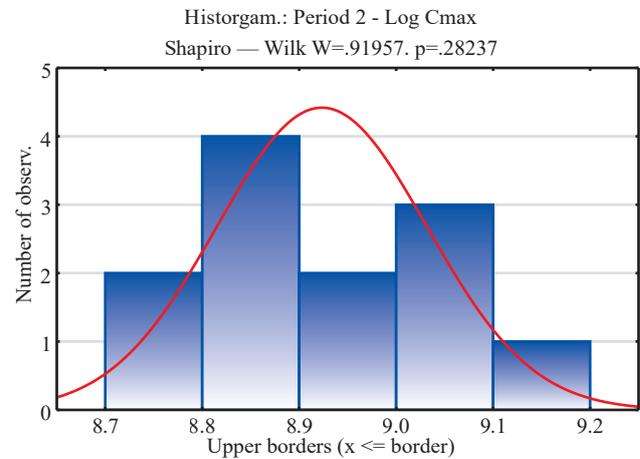
**Bioequivalence assessment.** The  $C_{max}$  and  $AUC_{0-t}$  values obtained from the pharmacokinetic analysis were subjected to logarithmic transformation using natural logarithms and further standard estimates (Fig. 3–6).



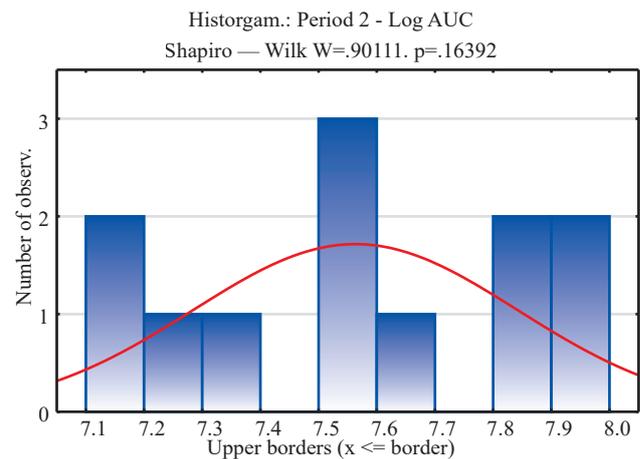
**Fig. 3.** Distribution of log-transformed amoxicillin AUC values, period II

The results obtained indicate that the 90 % confidence intervals of the  $C_{maxI}/C_{maxR}$  and  $AUC_{0-tI}/AUC_{0-tR}$  ratios of amoxicillin and clavulanic acid are within the

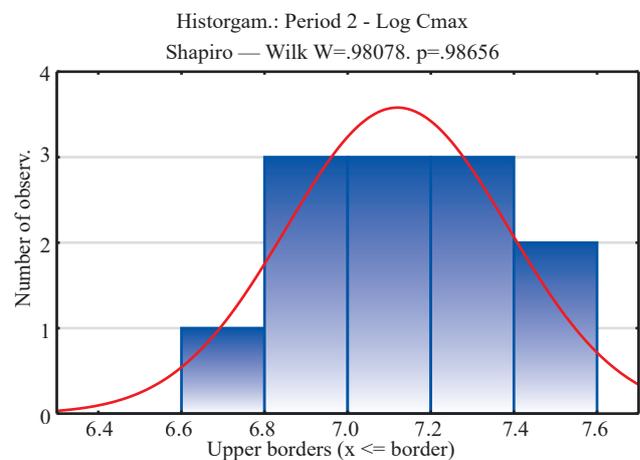
range of 80–125 %, therefore, “Amoxitron chewable tablets” and “Synulox” are bioequivalent in terms of active ingredients.



**Fig. 4.** Distribution of log-transformed amoxicillin  $C_{max}$  values, period II



**Fig. 5.** Distribution of log-transformed clavulanic acid AUC values, period II



**Fig. 6.** Distribution of log-transformed clavulanic acid  $C_{max}$  values, period II

#### REFERENCES

1. *Danilevskaya N. V.* Difficulties in the use of antibiotics in the treatment of small domestic animals / N. V. Danilevskaya, V. V. Subbotin // *VetPharma*. — 2011. — No. 3—4. — P. 49—55
2. *Nikanorova A. M.* Dirofilariosis of carnivores in Kaluga region / A. M. Nikanorova // *Teoriya i praktika borby s parazitarnymi boleznyami (Theory and practice of combating parasitic diseases)*. — 2017. — No. 18. — P. 309—312.
3. *Simdzhi, Sh.* Rational use of antibiotics in animal husbandry and veterinary medicine / Sh. Simji, R. Dul, R. S. Kozlov // *KMAKh*. 2016. No. 3. — P. 186—190.
4. *Dekhnich A. V.* Epidemiology of antibiotic resistance of nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* in Russia: results of a multicenter study / A. Dekhnich, I. A. Eydelshteyn, A. D. Narezkina et al. // *KMAKh*. — 2002. — V. 4. — No. 4. — P. 325—36.
5. *Mateus A.* Use of antibiotics for the treatment of dogs and cats in veterinary clinics in the UK / A. Mateus, D. C. Brodbelt, N. Barber, K.D.C. Stark // *JSAP Russian edition*. — 2011. — No. 6. — P. 6—11.
6. *Plumb D. C.* (2011). *Plumb's veterinary drug handbook*. Stockholm, Wis: PharmaVet.
7. *Stegemann M. R., Passmore C. A., Sherington J., Lindeman C. J., Papp G., Weigel D. J., Skogerboe T. L.* Antimicrobial Activity and Spectrum of Cefovecin, a New Extended-Spectrum Cephalosporin, against Pathogens Collected from Dogs and Cats in Europe and North America. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2006. — V. 50. — P. 2286—2292.
8. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, Tenth Edition. Edited by *Jim E. Riviere* and *Mark G. Papich*. 2018 JohnWiley & Sons.
9. EMA/CVMP/VICH/463202/2009 VICH topic GL49: Studies to evaluate the metabolism and residues kinetics of veterinary drugs in human food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/vich-gl49-studies-evaluate-metabolism-residue-kinetics-veterinary-drugs-food-producing-animals_en.pdf))
10. EMEA. Guideline in bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London (2011) ([https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf))
11. *Goncharova E. N., Gabidullina D. E., Selimov R. N., Koryakovtsev P. A., Karsakova Yu. V., Kozlov S. V., Komarov A. A., Engasheva E. S., Engashev S. V., Usha B. V., Glamazdin I. G., Udavliev D. I.* HPLC—MS/MS determination of amoxicillin in blood plasma using derivatization // *Sorbtsionnye i khromatograficheskie protsessy (Sorption and chromatographic processes)*. 2022. M. 22. No. 6. P. 816—828.
12. *Reyns T., Baere S., Croubels S., Backer P.* Determination of clavulanic acid in calf plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 2006; 41: 1414—1420.

#### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**S. V. Engashev** — Doctor of Veterinary Sciences, Academician of the RAS, Professor of the Department of Parasitology and Veterinary and Sanitary Expertise;

**A. A. Komarov** — Doctor of Biological Sciences, Professor of the RAS, Professor of the Department of Veterinary Medicine;

**A. B. Muromtsev** — Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Head of the Department of Zootechnics;

**D. D. Novikov** — Candidate of Veterinary Sciences, Deputy Director for Science;

**A. V. Mironenko** — Candidate of Veterinary Sciences, Scientific Associate of the Department of Science;

**E. N. Goncharova** — Candidate of Chemical Sciences, Head of the Laboratory;

**D. E. Gabidullina** — Senior Scientific Associate.

The article was submitted 14.02.2024.