

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДОВ УФ-СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ И ОБРАЩЕННО-ФАЗНОЙ ВЭЖХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНСТАНТЫ ИОНИЗАЦИИ НОВОГО БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СОЕДИНЕНИЯ

А.Т. Цечеев¹, Ю.Н. Карпенко^{1, 2}

¹ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» (Пермь, Россия)

²ООО «Парма Клиникал» (Пермь, Россия)

Для цитирования: Цечеев А.Т., Карпенко Ю.Н. Применение методов УФ-спектрофотометрии и обращенно-фазной ВЭЖХ для определения константы ионизации нового биологически активного соединения. *Аспирантский вестник Поволжья*. 2023;23(2):60-65. doi: 10.55531/2072-2354.2023.23.2.60-65

■ Сведения об авторах

Цечеев А.Т. – аспирант кафедры токсикологической химии. ORCID: 0000-0001-5774-9504

Карпенко Ю.Н. – канд. фарм. наук, доцент кафедры токсикологической химии. ORCID: 0000-0003-3174-3678

Рукопись получена: 15.09.2022

Рецензия получена: 18.03.2023

Решение о публикации: 16.05.2023

■ Аннотация

Цель – определение константы ионизации биологически активного соединения 2-АБФПК методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материал и методы. Объектом исследования являлась субстанция 2-АБФПК (2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид). Для определения константы ионизации были использованы методы УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Спектрофотометрический анализ проводили на спектрофотометре «Shimadzu UV-1800». Хроматографическое определение величины рКа осуществляли на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) с использованием обращенно-фазной колонки Zorbax Extend-C18.

Результаты. Установлено, что 2-АБФПК имеет одно значение рКа. При использовании двух разных методов для оценки величины константы ионизации получены сопоставимые результаты: 7,64 (метод УФ-спектрофотометрии) и 7,40 (метод обращенно-фазной ВЭЖХ).

■ **Ключевые слова:** рКа, высокоэффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, фармакокинетика, замещенные 2-аминопирролы.

■ **Конфликт интересов:** не заявлен.

■ Список сокращений

УФ – ультрафиолетовый; ОФ-ВЭЖХ – обращенно-фазная высокоэффективная жидкостная хроматография;

2-АБФПК – 2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамид.

■ Финансирование

Исследование выполнено при финансовой поддержке Пермского научно-образовательного центра «Рациональное использование».

APPLICATION OF UV SPECTROPHOTOMETRY AND REVERSED-PHASE HPLC TO DETERMINE THE IONIZATION CONSTANT OF A NEW BIOLOGICALLY ACTIVE COMPOUND

Artur T. Tsecheev¹, Yurii N. Karpenko^{1, 2}

¹Perm State Pharmaceutical Academy (Perm, Russia)

²Parma Clinical LLC (Perm, Russia)

Citation: Tsecheev AT, Karpenko YuN. Application of UV spectrophotometry and reversed-phase HPLC to determine the ionization constant of a new biologically active compound. *Aspirantskiy vestnik Povolzhia*. 2023;23(2):60-65. doi: 10.55531/2072-2354.2023.23.2.60-65

■ Information about authors

Artur T. Tsecheev – a postgraduate student of the Department of Toxicological chemistry. ORCID: 0000-0001-5774-9504

Yurii N. Karpenko – PhD, Associate professor of the Department of Toxicological chemistry. ORCID: 0000-0003-3174-3678

Received: 15.09.2022

Revision Received: 18.03.2023

Accepted: 16.05.2023

■ Abstract

Aim – to determine the ionization constant (pKa) of the biologically active compound 2-ABPPC by UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography (HPLC).

Material and methods. The object of the study was the substance 2-ABPPC (2-amino-1-(4-bromophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamide). The methods of UV spectrophotometry and high performance liquid chromatography were used to determine the ionization constant. The spectrophotometric analysis was carried out on a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. The chromatographic determination of the pKa value was carried out on an LC-20 Prominence liquid chromatograph (Shimadzu) using a Zorbax Extend-C18 reversed-phase column.

Results. In the course of study, it was found that 2-ABPPC has one pKa value. When using two different methods to estimate the ionization constant, the comparable results were obtained: 7.64 (UV spectrophotometry method) and 7.40 (reversed phase HPLC method).

■ **Keywords:** pKa, high performance liquid chromatography, UV spectrophotometry, pharmacokinetics, substituted 2-aminopyrroles.

■ **Conflict of interest:** *nothing to disclose.*

■ Study funding

The study was financially supported by the Perm Scientific and Educational Center "Rational Subsoil Use".

ВВЕДЕНИЕ

Одним из направлений научных исследований, проводимых в Пермской государственной фармацевтической академии, является синтез и изучение биологической активности производных 2-аминопиррола. Синтезированные под руководством профессора Н.М. Игидова 2-аминопирролкарбоксамиды демонстрируют на опухолевых клетках различного происхождения цитотоксическую активность, превышающую активность препаратов сравнения (паклитаксела и иматиниба) [1].

2-амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3 карбоксамид (2-АБФПК) является перспективным для дальнейших исследований соединением данного класса, благодаря высокой активности, простой схеме синтеза и очистки. Структура соединения представлена на **рисунке 1**.

Важной физико-химической характеристикой биологически активного соединения является константа ионизации (pKa), определяющая его фармакокинетические свойства и способность связываться с рецепторами [2, 3]. Кроме того, значение pKa имеет большое значение в процессе разработки методов анализа нового соединения, например, при выборе pH элюента в высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), условий жидкость-жидкостной экстракции вещества из биологических жидкостей и тканей и т.д. [4].

Следовательно, определение величины pKa – необходимый этап доклинического исследования потенциального лекарственного средства.

Определение константы ионизации проводили с соблюдением требования руководства GLP "Dissociation Constants in Water".

Для определения константы ионизации применяются различные методы: потенциометрия, кондуктометрия, капиллярный электрофорез, спектрофотометрия в УФ- и видимой области спектра, высокоэффективная жидкостная хроматография и т.д. [5]. Одним из наиболее простых и доступных методов определения pKa является потенциометрическое титрование. Однако использование потенциометрии в анализе 2-АБФПК затруднительно ввиду его плохой растворимости.

Ранее проведенные исследования [6] подтвердили влияние pH растворителя на характер УФ-спектра 2-АБФПК, что делает возможным использование УФ-спектрофотометрии для оценки его константы ионизации. В настоящее время для определения pKa биологически активных соединений также активно

применяется высокоэффективная жидкостная хроматография [7]. Низкая растворимость в воде и возможное наличие примесей в тестируемых соединениях не являются ограничением для метода ВЭЖХ.

ЦЕЛЬ

Определение константы ионизации биологически активного соединения 2-АБФПК методами УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования выступала субстанция 2-АБФПК (серия 0922), очищенная путем двукратной перекристаллизации из абсолютного этанола. Содержание 2-АБФПК в субстанции 99,78%.

Спектрофотометрическое определение pKa

Для определения константы ионизации спектрофотометрическим методом использовали методику, разработанную А. Альбертом и Е. Сергентом [8]. Методика основана на измерении спектров равновесной смеси прототропных форм соединения при нескольких значениях pH вблизи предполагаемого значения pKa.

Ультрафиолетовые спектры регистрировали на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 в области от 200 до 400 нм.

Фосфатный буферный раствор с pH 3,0 на основе калия дигидрофосфата был приготовлен в соответствии с ОФС.1.3.0003.15 «Буферные растворы». Из данного буфера готовили остальные буферные растворы (pH от 1,67 до 12,00 с шагом в 1 единицу) путем добавления 0,1М раствора ортофосфорной

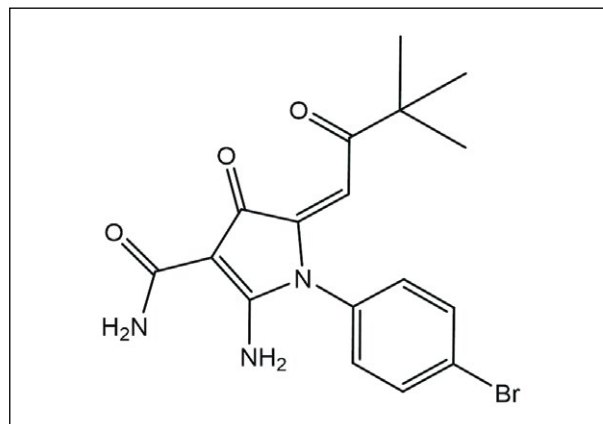


Рисунок 1. Структура 2-АБФПК.

Figure 1. Structure of 2-ABPPC.

кислоты или 0,1М раствора гидроксида натрия до требуемого значения рН. В качестве крайних точек использовали титрованные растворы 0,1М кислоты хлористоводородной и гидроксида натрия, приготовленные согласно ОФС.1.3.0002.15 «Титрованные растворы». Контроль рН-растворов осуществляли на иономере «И-500» (Аквилон).

Для подтверждения того, что в крайних точках вещество полностью ионизировано (для 0,1М NaOH) или не ионизировано (0,1М HCl), регистрировали УФ-спектры 2-АБФПК в 0,01М NaOH и 0,01М HCl, что согласуется с методикой А. Альберта и Е. Сержента [8]. Отклонение в величинах оптической плотности не превышало 1%, что свидетельствует о том, что в крайних точках существует только либо ионизированная, либо неионизированная молекула. Учитывая плохую растворимость 2-АБФПК в воде, готовили исходный метанольный раствор субстанции с концентрацией 100 мкг/мл. Рабочие растворы с концентрацией 10 мкг/мл получали путем разведения исходного раствора соответствующим буферным раствором.

Поскольку ранее для 2-аминопирролкарбоксамидов исследования по определению показателя ионизации не проводились, для предварительной оценки величины рКа был использован метод определения точки «перегиба» на графике зависимости оптической плотности от рН, в ходе которого регистрировались УФ-спектры поглощения 2-АБФПК в широком диапазоне рН (от 1 до 12). Точка перегиба на кривой принималась за приблизительное значение константы ионизации.

Далее для более точного определения константы анализировали УФ-спектры 2-АБФПК в узком интервале значений рН, вблизи которых фиксировалось предварительное значение рКа. Расчет рКа производили по формуле:

$$pK_a = pH + \lg \frac{A_m - A_x}{A_x - A_i};$$

где A_m – это оптическая плотность неионизированного соединения, A_x – оптическая плотность соединения в соответствующих буферных растворах (рН от 1,67 до 12,00 с шагом в единицу), A_i – оптическая плотность ионизированного соединения.

Определение рКа методом ВЭЖХ

Определение рКа методом ВЭЖХ основано на различной способности ионизированных и неионизированных форм аналита удерживаться на обращенно-фазном сорбенте в зависимости от рН среды подвижной фазы.

Объектом исследования являлся метанольный раствор 2-АБФПК и нитрата калия (неудерживаемый компонент). Концентрация соединений в растворе составила 100 мкг/мл.

Хроматографический анализ проводили на жидкостном хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu) с диодноматричным детектором SPD-M20A.

Условия хроматографирования: хроматографическая колонка: Zorbax Extend-C18 (4,6×150 мм, 3,5 мкм);

температура термостата 40°C; режим элюирования изократический; скорость потока элюента: 1 мл/мин.

В качестве подвижной фазы использовали элюент состава ацетонитрил – фосфатный буфер (35:65). Фосфатные буферные растворы с различными значениями рН готовили аналогично, как для спектрофотометрического определения. Исследования осуществляли в диапазоне рН элюентов от 2 до 11,5, рекомендованном производителем хроматографической колонки.

Коэффициенты удерживания 2-АБФПК рассчитывали по формуле:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0};$$

где t_R – время удерживания 2-АБФПК, t_0 – время удерживания неудерживаемого компонента (KNO_3). По рассчитанным коэффициентам удерживания строили дифференциальную кривую в координатах $\Delta k' / \Delta pH$ – рН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Спектрофотометрическое определение

Анализ спектров 2-АБФПК, снятых в диапазоне рН 1-10, показал наличие выраженного максимума поглощения при 250 нм, а также «плеча» при 225 нм. В сильнощелочной среде (рН > 11) наблюдается bathochromный сдвиг и появляются максимумы поглощения при 216 и 336 нм (рисунок 2).

Для предварительного определения рКа и построения графика зависимости оптической плотности от рН была выбрана длина волны 250 нм, соответствующая максимальному поглощению 2-АБФПК.

Согласно построенному графику (рисунок 3), точка перегиба, определяемая наибольшим изменением оптической плотности исследуемого соединения, располагается в области рН около 8,2.

Используя приблизительное значение рКа, далее определяли точное значение в узком интервале рН от 7,2 до 8,23 с шагом в 0,2. Для этого регистрировали

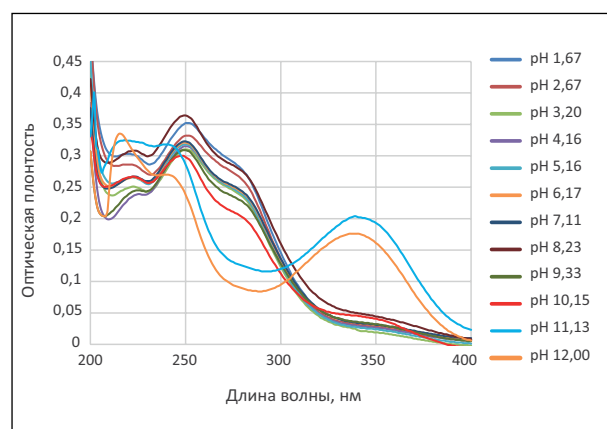


Рисунок 2. УФ-спектры поглощения 2-АБФПК при разных значениях рН буферных растворов.

Figure 2. UV absorption spectra of 2-ABPPC at different buffers' pH values.

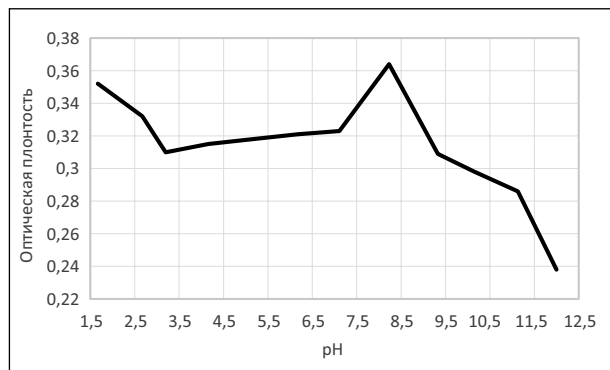


Рисунок 3. Зависимость оптической плотности 2-АБФПК от pH при 250 нм.

Figure 3. Dependence of the optical density of 2-ABPPC on the pH at 250 nm.

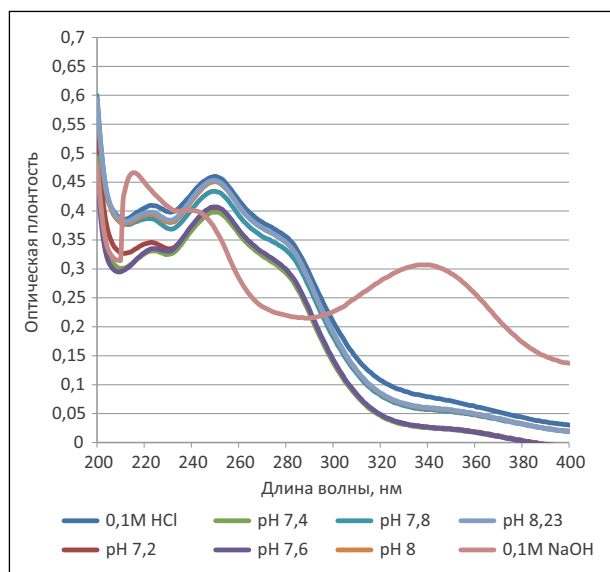


Рисунок 4. УФ-спектры 2-АБФПК в буферных растворах (pH 7,2–8,23).

Figure 4. UV absorption spectra of 2-ABPPC in buffer solutions (pH 7.2–8.23).

спектры 2-АБФПК в буферных растворах с соответствующим pH (рисунк 4).

Оптическая плотность раствора 2-АБФПК при 250 нм при каждом pH использовалась в расчетах точного значения pKa. Результаты определения константы ионизации представлены в таблице 1. Среднее значение pKa 2-АБФПК составило $7,64 \pm 0,14$.

Оценка метрологических характеристик осуществлялась с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2019. Расчет граничных значений доверительного интервала проводился по критерию Стьюдента.

Для оценки воспроизводимости получаемых результатов были проведены дополнительные эксперименты по определению pKa 2-АБФПК методом УФ-спектрофотометрии с привлечением двух химиков. Исследования проводились в разные дни, на разных

Таблица 1 / Table 1

Результаты определения pKa методом УФ-спектрофотометрии

Results of pKa determination by UV spectrophotometry

pH	Оптическая плотность при 250 нм (n = 3)	pKa	Оптическая плотность в крайних точках						
7,2	0,401	7,53	Am (в 0,1M HCl) = 0,47; Ai (в 0,1M NaOH) = 0,369						
7,4	0,398	7,79							
7,6	0,407	7,82							
7,8	0,434	7,52							
8,02	0,445	7,54							
8,23	0,450	7,62							
Метрологические характеристики									
n	f	\bar{x}	s^2	s	P, %	$s\bar{x}$	t(P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}$
6	5	7,64	0,02	0,134	95,0	0,06	2,57	0,14	1,84

Примечание: n – объем выборки; f – число степеней свободы; \bar{x} – среднее значение константы ионизации; s^2 – дисперсия; s – стандартное отклонение; P – доверительная вероятность; $s\bar{x}$ – стандартное отклонение среднего результата; $t(P,f)$ – табличное значение критерия Стьюдента; $\Delta\bar{x}$ – полуширина доверительного интервала среднего значения; $\bar{\epsilon}$ – относительная погрешность среднего результата.

приборах. Полученные результаты представлены в таблице 2.

Рассчитанный критерий Фишера не превышает табличного значения для 6 измерений, что подтверждает воспроизводимость результатов.

С целью подтверждения у 2-АБФПК только одного значения pKa был использован подход [10, 11], основанный на измерении поглощения соединения в буферных растворах с различными значениями pH (1–12) при двух длинах волн (248 и 250 нм). По результатам эксперимента была построена диаграмма поглощения 2-АБФПК (рисунк 5). Кривая диаграммы имеет линейный вид (коэффициент детерминации R^2 более 0,99), что свидетельствует о наличии одного равновесия в системе ионизации

Таблица 2 / Table 2

Результаты оценки воспроизводимости определения pKa методом УФ-спектрофотометрии

Results of evaluation of repeatability of pKa determination by UV spectrophotometry

Результаты определения pKa 2-АБФПК		
№	Химик 1	Химик 2
1	7,53	7,75
2	7,79	7,43
3	7,66	7,86
4	7,52	7,54
5	7,34	7,47
6	7,62	7,91
pK _{ср}	7,58	7,66
SD	0,15	0,21
Г _{эсп.}	1,96	
Г _{табл.}	5,05	

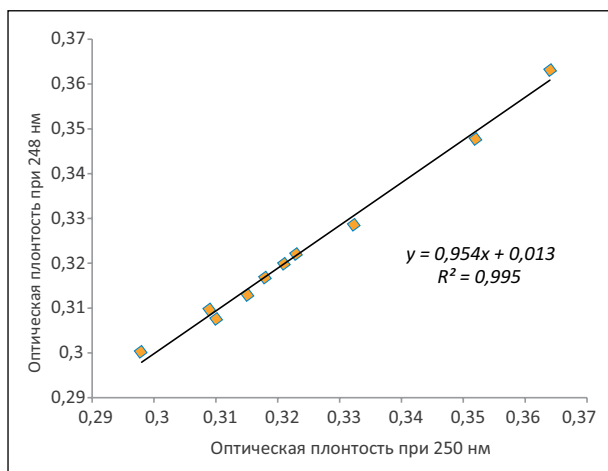


Рисунок 5. Диаграмма поглощения 2-АБФПК в различных буферных растворах (рН 1–12).

Figure 5. Absorbance diagram of 2-ABPPC in different buffer solutions (pH 1–12).

исследуемого соединения и, следовательно, одного значения рКа.

Хроматографическое определение

Способность удерживаться на сорбенте в хроматографической колонке зависит от полярности аналита. При изменении рН подвижной фазы меняется соотношение ионизированных и неионизированных форм соединения, следовательно, будет изменяться и его фактор удерживания (коэффициент емкости).

Ранее проведенные исследования показали, что оптимальный диапазон значений коэффициента емкости 2-АБФПК наблюдается при содержании ацетонитрила в водно-ацетонитрильных подвижных фазах от 50% до 35% [12]. В эксперименте по определению константы ионизации использовали элюенты с 35% содержанием ацетонитрила для достижения максимального различия времени удерживания исследуемого соединения при разных значениях рН с учетом приемлемой длительности хроматографического анализа.

Таблица 3 / Table 3

Хроматографические параметры 2-АБФПК при различных рН элюентов

Chromatographic parameters of 2-ABPPC at different pH level of eluents

pH	t_0 (n = 3)	t_R (n = 3)	k'	$\Delta k' / \Delta pH$
2,33	1,29	10,65	7,26	
3,36	1,27	11,53	8,08	0,80
4,66	1,22	12,32	9,1	0,78
5,6	1,21	13,16	9,88	0,83
6,19	1,21	13,67	10,3	0,71
6,9	1,2	14,31	10,93	0,89
7,37	1,19	15,1	11,69	1,62
8,32	1,19	15,99	12,44	0,79
9,4	1,19	18,3	14,38	1,80
10,15	1,21	20,75	16,15	2,36
11,10	1,18	25,04	20,22	4,28

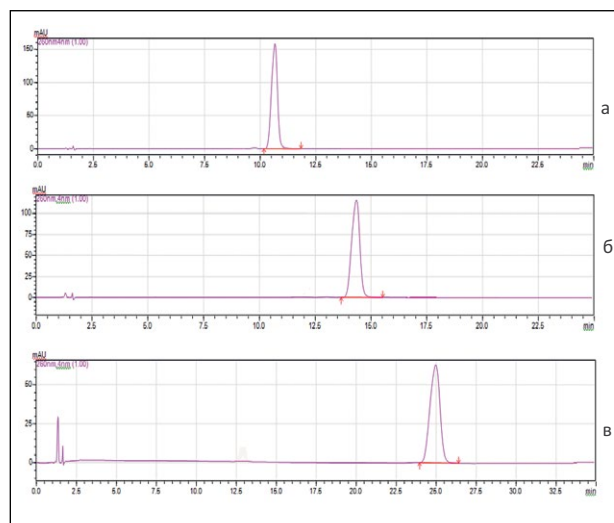


Рисунок 6. Хроматограммы 2-АБФПК, полученные при различных рН элюента (а – 2,35; б – 6,90; в – 11,10).

Figure 6. Chromatograms of 2-ABPPC at different pH level of the eluent (a – 2.35; б – 6.90; в – 11.10).

Растворы 2-АБФПК (100 мкг/мл) хроматографировали в трехкратной повторности для каждого значения рН подвижной фазы в интервале от 2 до 11. Примеры полученных хроматограмм представлены на рисунке 6.

Коэффициент емкости для каждого значения рН рассчитывали по среднему значению трех повторных инъекций с использованием нитрата калия в качестве индикатора «мертвого объема» (t_0). Результаты расчетов представлены в таблице 3.

По полученным данным была построена дифференциальная кривая (рисунок 7).

Перегиб дифференциальной кривой в точке с рН 7,4 соответствует значению рКа 2-АБФПК.

Выводы

Определяемый на этапе доклинических исследований показатель константы ионизации (рКа) является важной характеристикой биологически

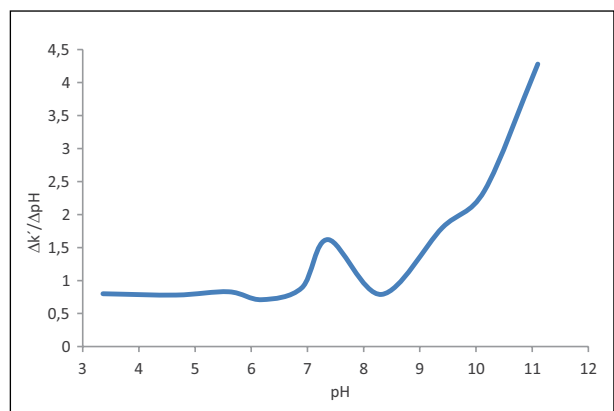


Рисунок 7. Кривая первой производной для определения рКа.

Figure 7. The first derivative curve for pKa determination.

активных соединений. Нами впервые было определено значение рКа нового соединения 2-АБФПК, обладающего цитотоксической активностью, с помощью двух методов: УФ-спектрофотометрии и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Полученные результаты (7,64 методом УФ-спектрофотометрии и 7,40 методом ОФ-ВЭЖХ) сопоставимы и указывают на наличие у исследуемого соединения свойств слабой кислоты.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. 2-amino-1-(4-bromophenyl)-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxamide exhibiting cytotoxic activity against human tumoral cells. Patent №2 753 480 Russian Federation №2020130076; application 14.09.20; published 17.08.21. Bull. №23. 9 p. (In Russ.). [2-Амино-1-(4-бромфенил)-5-(3,3-диметил-2-оксобутилен)-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксамид, проявляющий цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток человека. Патент №2 753 480. Российская Федерация №2020130076; заявл. 14.09.20; опубл. 17.08.21, Бюллетень №23, 9 с.].
2. Box K, Comer J. Using Measured pKa, LogP and Solubility to Investigate Supersaturation and Predict BCS Class. *Curr Drug Metab.* 2008;9(9):869-878. doi: 10.2174/138920008786485155
3. Watkins W, Landaverry Y, Léger R, et al. The relationship between physicochemical properties, *In vitro* activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-Containing efflux pump inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 2003;13(23):4241-4244. doi: 10.1016/j.bmcl.2003.07.030
4. Bulgakova EA, Karpenko YuN, Yarygina TI. Determination of 3-hydroxy-3-pyrroline-2-one in urine and study of its excretion from the organism of laboratory animals. *Pharmacy & Pharmacology.* 2017;5(4):331-343. (In Russ.). [Булгакова Е.А., Карпенко Ю.Н., Ярыгина Т.И. Определение производного 3-гидрокси-3-пирролин-2-она в моче и изучение его экскреции из организма лабораторных животных. *Фармация и фармакология.* 2017;5(4):331-343]. doi: 10.19163/2307-9266-2017-5-4-331-343
5. Reijenga J, van Hoof A, van Loon A, Teunissen B. Development of Methods for the Determination of pKa Values. *Anal Chem Insights.* 2013;8:53-71. doi: 10.4137/aci.s12304
6. Tsecheev AT, Karpenko YuN, Igidov NM. UV spectrophotometry in the analysis of a new derivative 2-aminopyrrole with anti-tumor activity. *Journal of pharmaceuticals quality assurance issue.* 2022;2(36):4-10. (In Russ.). [Цечеев А.Т., Карпенко Ю.Н., Игидов Н.М. Метод УФ-спектрофотометрии в анализе нового производного 2-аминопиррола с противоопухолевой активностью. *Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.* 2022;2(36):4-10].
7. Hossain MF, Obi C, Shrestha A, Khan MOF. UV-Metric, pH-Metric and RP-HPLC Methods to Evaluate the Multiple pKa Values of a Polyprotic Basic Novel Antimalarial Drug Lead, Cyclen Bisquinoline. *Mod Chem Appl.* 2014;2(4):1-7. doi: 10.4172/2329-6798.1000145
8. Albert A, Serjeant EP. *Ionisation Constants of Acids and Bases: a laboratory manual.* London: Methuen & Co Ltd, 1962.
9. Pandey M, Jaipal A, Kumar A, et al. Determination of pKa of felodipine using UV-Visible spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2013;115:887-890. doi: 10.1016/j.saa.2013.07.001
10. Singh S, Sharda N, Mahajan L. Spectrophotometric determination of pKa of nimesulide. *Int J Pharm.* 1999;176(2):261-264. doi: 10.1016/s0378-5173(98)00304-4
11. Blanco S, Almandoz M, Ferretti F. Determination of the overlapping pKa values of resorcinol using UV-visible spectroscopy and DFT methods. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy.* 2005;61(1-2):93-102. doi: 10.1016/j.saa.2004.03.020
12. Tsecheev AT, Karpenko YuN. Development of HPLC conditions for assessing the quality of a new biologically active compound with cytotoxic activity. In: *Pharmaceutical education SamSMU. History, modernity, prospects.* Samara, 2021:185-190. (In Russ.). [Цечеев А.Т., Карпенко Ю.Н. Разработка условий ВЭЖХ для оценки качества нового биологически активного соединения с цитотоксической активностью. В сб.: *Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы.* Самара, 2021:185-190].

■ Автор для переписки

Цечеев Артур Тимурович
Адрес: Пермская государственная фармацевтическая академия,
ул. Полевая, 2, г. Пермь, Россия, 614990.

■ Corresponding Author

Arthur T. Tsecheev
Address: Perm State Pharmaceutical Academy,
2 Polevaya st., Perm, Russia, 614990.

E-mail: arthurtse@yandex.ru