

На правах рукописи



ЩЕРБАКОВ ДЕНИС ПАВЛОВИЧ

**ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ ИЗ ГРУППЫ БЕНЗИМИДАЗОЛА В УСЛОВИЯХ ХИМИКО-
ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Курск – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор
Шорманов Владимир Камбулатович

Официальные оппоненты: **Мельникова Нина Борисовна,**
доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», кафедра аналитической и медицинской химии, профессор;

Калёкин Роман Анатольевич,
доктор фармацевтических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский центр судебно-медицинской экспертизы» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория судебно-химических и химико-токсикологических исследований, заведующий.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва.

Защита диссертации состоится 23 декабря 2022 г. в 12 ч. на заседании диссертационного совета 24.2.312.03, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет», по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, д. 68, зал заседаний Ученого совета, А-330.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский национальный исследовательский технологический университет» и на сайте КНИТУ <https://www.kstu.ru/servlet/contentblob?id=432712>.

Отзывы на автореферат в двух экземплярах просим направлять по адресу: 420015, г. Казань, ул. Карла Маркса, д. 68, КНИТУ, ученому секретарю диссертационного совета 24.2.312.03 и по e-mail: gulia_nn@yahoo.com.

Автореферат разослан «____» _____ 2022 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета



Нугуманова Гульнара Наиловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Биологически активные вещества производные бензимидазола, такие как альбендазол ([5-(пропилтио)-1Н-бензимидазол-2-ил] карбаминовой кислоты метиловый эфир) и мебендазол (5-бензоил-2-метоксикарбониламино-бензимидазол), применяются в качестве антигельминтных лекарственных средств для людей и животных. Тиабендазол (2-(4-тиазолил)-1Н-бензимидазол) известен в качестве фунгицида широкого спектра действия.

Рассматриваемые соединения имеют выраженную токсичность для человека и других теплокровных организмов. ЛД₅₀ тиабендазола, альбендазола и мебендазола составляет соответственно 3330, 1500 и 1280 мг/кг для крыс при условии введения токсикантов в желудок.

Передозировка этих веществ инициирует головные и эпигастральные боли, диспепсические расстройства, нарушения функциональности печени, вплоть до развития гепатита, развитие алопеции, есть данные о влиянии альбендазола на ЦНС.

Исследования в ветеринарии показывают негативное влияние альбендазола и мебендазола на развитие плода.

Описаны отравления людей производными бензимидазола, в том числе и смертельные. Причиной отравлений этими токсикантами могут быть их неосторожное применение, несоблюдение терапевтических доз, возможное использование при попытках самоубийств, а также употребление продуктов, содержащих их остаточные количества.

Всё это подчёркивает важное токсикологическое значение рассматриваемых биологически активных соединений и необходимость их всестороннего исследования в химико-токсикологическом отношении.

Степень разработанности темы. Исследование литературных данных выявило недостаточную изученность вопросов изолирования производных бензимидазола из биоматериала, очистки от соэкстрактивных веществ, качественного и количественного определения, распределения в организме теплокровных, сохраняемости в трупном материале.

Принимая во внимание все вышесказанное, разработка методик изолирования объектов исследования из тканей органов и биологических жидкостей, очистки и определения является актуальной.

Цель исследования. Разработка методик извлечения из биологического материала, очистки, обнаружения и количественного определения альбендазола, мебендазола и тиабендазола в условиях химико-токсикологического анализа.

Задачи исследования. Для решения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- исследовать особенности получения аналитических форм тиабендазола, альбендазола и мебендазола, доказать индивидуальность полученных веществ, выявить их структуру и разработать варианты количественного определения;
- изучить возможность идентификации производных бензимидазола различными методами хроматографии (тонкослойная, колоночная газовая, колоночная жидкостная), электронной спектрофотометрии, в также методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС;

- исследовать различные способы определения количественного содержания изучаемых соединений методами газовой хроматографии с масс-селективным детектированием, спектрофотометрии и производной спектрофотометрии второго порядка;

- изучить особенности экстрагирования производных бензимидазола из водных растворов и характер их хроматографического поведения в полупрепаративной колонке сорбента. Разработать схемы очистки аналитов от эндогенных компонентов биоматериала экстракцией и колоночной хроматографией обычного давления;

- выявить условия оптимального изолирования тиабендазола, альбендазола и мебендазола настаиванием с органическими и неорганическими жидкостями и возможные варианты их очистки от соэкстрактивных веществ хроматографией и экстракцией;

- разработать методики определения производных бензимидазола в биологических матрицах, провести в их отношении валидационные мероприятия;

- изучить сохраняемость производных бензимидазола в гнилостно разлагающемся биологическом материале и характер их распределения в теплокровных организмах.

Научная новизна. Определены особенности хроматографической активности производных бензимидазола в сорбентах различной химической природы при воспроизведении методов тонкослойной, жидкостной и газо-жидкостной колоночной хроматографии.

Выявлены группы характерных заряженных частиц в масс-спектрах альбендазола и тиабендазола, а также триметилсилильных и ацетильных производных тиабендазола, альбендазола и мебендазола при ионизации молекул электронным ударом (ГХ-МС) или методом электроспрея (ЖХ-МС/МС).

Разработаны и статистически охарактеризованы различные варианты оценки количественного содержания аналитов на основе методов газовой хроматографии с масс-селективным детектированием и электронной спектрофотометрии.

На примере тиабендазола изучены особенности распределения аналитов между водной и органическими фазами в процессе их динамического контакта. Установлено, что в наибольшей степени аналит извлекается из водных растворов дихлорметаном при pH 5 водного слоя и его насыщении хлоридом натрия.

Разработаны эффективные способы очистки анализируемых соединений от соэкстрактивных веществ биологического материала методом колоночной нормальнофазовой хроматографии и его сочетанием с жидкость-жидкостной экстракцией.

Обоснована возможность использования диметилкетона как оптимального изолирующего агента для извлечения анализируемых соединений из биоматериала в режиме настаивания. Выявлены оптимальные условия изолирования диметилкетонем (двукратная инфузия по полчаса, соотношение масс изолирующего агента и биоматрицы 2:1) и разработаны методики определения производных бензимидазола в твёрдых (органы и ткани) и жидких (кровь, плазма) биологических матрицах.

Показано соответствие разработанных методик количественного определения исследуемых производных бензимидазола в печени, крови и плазме основным валидационным критериям.

Определены закономерности распределения тиабендазола, альбендазола и мебендазола у теплокровных (модельный организм – крысы) и устойчивости данных соединений в трупном материале.

Разработаны 2 варианта общей схемы исследования биоматериала при доказательстве отравлений производными бензимидазола, на основе изолирования аналитов диметилкетонем и очистки колоночной хроматографией обычного давления или её сочетанием с экстракцией.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные в ходе выполнения настоящей работы результаты химико-токсикологического исследования производных бензимидазола (тиабендазола, альбендазола и мебендазола) расширяют представления о химических, токсикологических и физико-химических свойствах данных соединений. Проведённые исследования и полученные результаты представляют собой основу для разработки и практического приложения методик химико-токсикологического анализа рассматриваемых аналитов.

По результатам выполненных экспериментов осуществлена разработка оригинальной схемы изолирования из сложных биологического матриц, очистки, идентификации и количественного определения производных бензимидазола, позволяющая повысить надёжность и достоверность доказательства отравлений данными веществами, а также сократить время проведения анализа в силу использования высокотехнологичного оборудования.

Результаты исследования внедрены в работу химико-токсикологической лаборатории ГУЗ «Липецкий областной наркологический диспансер», в учебный процесс кафедры фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Минздрава России и кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Методология и методы исследования. Методология исследований заключалась в изучении особенностей изолирования, очистки, дериватизации и определения производных бензимидазола, их распределения у теплокровных и сохраняемости в биоматериале. При этом использовались современные методы: экстракция, ТСХ и колоночная хроматография обычного давления, электронная и ИК- спектрофотометрия, ГХ-МС и ЖХ-МС/МС. Разработка методик для определения изучаемых веществ в биологических матрицах проводилась с использованием экспериментальных модельных смесей с заданными количествами определяемых соединений. Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с установленными ГФ XIII требованиями с использованием комплекса прикладных программ «Microsoft Excel 2016». Валидация разработанных методик проводилась в соответствии с требованиями нормативных документов, принятых в области химико-токсикологического и биологического анализа.

Апробация результатов работы. Основные положения работы апробированы на XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017 г.), на международной научно-практической конференции «Новшества в медицине и фармакологии» (Тюмень, 2017 г.), на международной научно-практической

конференции «Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития» (Уфа, 2017 г.), на 83-ей Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежная наука и современность», посвященной 83-летию КГМУ и 85-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова (Курск, 2018 г.), на V Всероссийском симпозиуме «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Краснодар, 2018 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по пункту 4 «Разработка методов анализа лекарственных веществ и их метаболитов в биологических объектах для фармакокинетических исследований, эколого-фармацевтического мониторинга, судебно-химической и наркологической экспертизы».

Основные положения, выносимые на защиту:

- синтез аналитических форм (ацетильных и силильных дериватов) 2-(4-тиазолил)-1Н-бензимидазола, [5-(пропилтио)-1Н-бензимидазол-2-ил] карбаминовой кислоты метилового эфира и 5-бензоил-2-метоксикарбониламино-бензимидазола и подтверждение их структуры;
- особенности поглощения электромагнитного излучения изучаемыми соединениями в УФ- и ИК- областях;
- данные по изучению хроматографической активности производных бензимидазола и их аналитических форм в тонких слоях и колонках различных сорбентов;
- варианты идентификации производных бензимидазола методами ТСХ, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС и спектрофотометрии, особенности хромато-масс-спектрометрии их триметилсилильных и ацетильных дериватов;
- варианты оценки количественного содержания производных бензимидазола методами ГХ-МС, спектрофотометрии и производной спектрофотометрии второго порядка;
- схемы очистки производных бензимидазола методами колоночной хроматографии и жидкость-жидкостной экстракции;
- методики изолирования рассматриваемых соединений из биологического материала методом настаивания с диметилкетонем и последующей очистки от соэкстрактивных веществ;
- результаты изучения стабильности производных бензимидазола в разлагающемся биологическом материале;
- особенности распределения аналитов в теплокровных организмах (крысы) после внутрижелудочного введения отравляющих агентов.

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, использованием современных методов исследования, валидацией разработанных методик, статистической обработкой данных по требованиям ГФ 13 с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel 2016». Диссертационная работа выполнена по плану научно-исследовательских работ кафедры фармацевтической, токсикологической и аналитической химии Курского

государственного медицинского университета и соответствует проблеме «Фармация» межведомственного научного совета № 36 РАМН и научной проблеме 35.04 «Научные проблемы судебно-медицинской токсикологии, токсикологической и судебной химии» по специальности «Судебная медицина» при РАМН. Номер госрегистрации 01201377075.

Личный вклад автора. Автор диссертации принимал непосредственное участие во всех этапах исследования: им составлен общий план и разработана структура исследований, проведен анализ отечественных и зарубежных литературных источников по теме диссертации, выполнены экспериментальные исследования, проведены статистическая обработка, валидация и анализ данных, сделаны выводы и заключения. В работах, выполненных в соавторстве, использованы результаты исследования с долей участия автора 80-95%.

Публикации. Содержание работы отражено в 10 публикациях, из них 2 статьи опубликованы в журналах, индексируемых в базах Scopus и Web of Science, 2 статьи - в журналах списка ВАК, рекомендуемых для опубликования материалов диссертаций, 1 патент на изобретение, 5 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (главы 2, 3, 4, 5 и 6), выводов, списка литературы и приложения. Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста, содержит 73 таблицы (из них 42 вынесены в приложение) и 41 рисунок. Библиографический список состоит из 137 источников, в том числе 104 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты исследования: тиабендазол (2-(4-тиазолил)-1H-бензимидазол) (ГСО 7720-99) с содержанием основного вещества $\geq 98\%$); альбендазол ([5(Пропилтио)-1H-бензимидазол-2-ил]) карбаминовой кислоты метиловый эфир) фирмы «Sigma-Aldrich» (США) с содержанием основного вещества $\geq 98\%$, НД 42-12313-02; мебендазол (5-бензоил-2-метоксикарбониламино-бензимидазол) (НД 42-6939-05).

В рамках поиска оптимальных аналитических форм для определения исследуемых веществ методом ГХ-МС рассматривалась возможность получения их ацетильных и триметилсилильных производных.

При синтезе ацетильных производных исходное вещество растворяли в уксусном ангидриде при 70°C на водяной бане. Полученный раствор нагревали с обратным холодильником в течение 10 минут при 135-139°C. После окончания нагревания растворитель испаряли при 70-80°C. Остаток, лишенный растворителя, перекристаллизовывали из уксусного ангидрида.

При синтезе триметилсилильных производных исходное вещество нагревали 20 мин с N,O-бис(триметилсилил)трифторацетамидом (БСТФА), содержащим 1% триметилхлорсилана (ТМХС) на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Затем реакционную смесь разбавляли в 6 раз этилацетатом, прибавляли новую порцию силилирующего агента и нагревали на кипящей водяной бане 4-5 часов, поддерживая объем реакционной смеси на постоянном уровне этилацетатом, до полного растворения

вещества, и далее ещё нагревали 30 минут. После окончания нагревания растворитель испаряли, нагревая раствор при 80-85°C. Остаток, лишенный растворителя, перекристаллизовывали из этилацетата.

Индивидуальность полученных ацетильных и триметилсилильных производных доказывали с использованием методов ТСХ и ГХ-МС. Предполагаемую структуру дериватов подтверждали методами ГХ-МС и ИК-спектрофотометрии.

Таблица 1

Параметры определения синтезированных дериватов методами ИК-спектрофотометрии и ГХ-МС

Аналиты	ИК-СФМ	ГХ-МС	
	Максимумы полос, см ⁻¹ и виды колебаний	t, мин	Массовые числа частиц, m/z
Альбендазол	3321 (ν –NH–); 2954, 2920, 2851 (ν CH); 1709 (ν C=O); 1620, 1586, 1524, 1462 (ар. C=C); 1323 (ν –C-N–); 1228, 1196, 1096, 1061, 1007 (δ пл. ар. C-H); 768, 737 (δ внеп. ар. C-H)	8,84	43, 63, 78, 92, 105, 120, 134, 147, 164, 179, 190, 207 , 265
ТМС-альбендазол	2951, 2920, 2851 (ν CH); 1709 (ν C=O); 1589, 1512, 1458 (ар. C=C); 1269 (ν –C-N–); 1196, 1065, 1030 (δ пл. ар. C-H); 760 (δ внеп. ар. C-H)	7,94	43, 73, 103, 133, 177, 207 , 240, 265, 281, 327, 366, 405
Ацетил-альбендазол	2947, 2916, 2855 (ν CH); 1744, 1678 (ν C=O); 1605, 1582, 1512, 1462 (ар. C=C); 1292, 1254 (ν –C-N–); 1238 (ν ac.-C-O-C); 1219, 1177, 1057, 1026, 1007 (δ пл. ар. C-H); 756 (δ внеп. ар. C-H)	10,45	58 , 121, 161, 223, 284, 344, 414, 289, 549
Мебендазол	3402 (ν –NH–); 3071, 3044, 2951, 2920, 2854 (ν CH); 1717, 1654 (ν C=O); 1597, 1524, 1458 (ар. C=C); 1304, 1300, 1281 (ν –C-N–); 1200, 1157, 1092, 1026, 968 (δ пл. ар. C-H); 895, 864, 833, 764, 694 (δ внеп. ар. C-H)	-	-
ТМС-мебендазол	3402 (ν –NH–); 3040, 2940, 2920, 2855 (ν CH); 1717, 1647? (ν C=O); 1597, 1524, 1458 (ар. C=C); 1308, 1300, 1277, 1265 (ν –C-N–); 1200, 1092, 965 (δ пл. ар. C-H); 895, 833, 764 (δ внеп. ар. C-H)	10,27	45, 73, 106, 119, 160, 207, 253, 294, 309, 366 , 382, 429, 479
Ацетил-мебендазол	3075, 2951, 2924, 2855 (ν CH); 1732, 1705, 1694 (ν C=O); 1589, 1524, 1458 (ар. C=C); 1296, 1277, 1269 (ν –C-N–); 1177, 1107, 995 (δ пл. ар. C-H); 895, 764, 760, 694 (δ внеп. ар. C-H)	11,13	43, 77, 105, 115, 142, 160 , 196, 237, 279, 335, 415, 475, 549

Отсутствие в ИК-спектрах продуктов ацетилирования по сравнению с ИК-спектрами исходных веществ полосы ν –NH– колебаний свидетельствуют о замещении атомов водорода у атомов азота имидазольного цикла и амидной группы на ацетильные радикалы. Об этом также говорит присутствие в масс-спектрах продуктов ацетилирования сигналов с соответствующими массовыми числами.

В ИК-спектрах продуктов силилирования по сравнению с ИК-спектрами исходных веществ интенсивность полосы ν –NH– колебаний заметно снижается. Это может свидетельствовать о том, что триметилсилильный радикал замещает водород только у атома азота амидной группы. Это подтверждается также и тем, что в масс-спектрах триметилсилильных дериватов присутствуют сигналы осколков с соответствующими этим структурам массовыми числами.

Была изучена способность поглощать электромагнитное излучение рассматриваемыми соединениями из группы производных бензимидазола в различных органических растворителях и водных растворах различной реакции.

Для некоторых из них (ДМФА и ДМСО), выбранных в качестве оптимальных, рассчитаны оптические характеристики аналитов, представленные в табл. 2.

Таблица 2

Некоторые характеристики электронных спектров изучаемых соединений в среде ДМФА и ДМСО

Аналиты	Растворители	$\lambda_{\text{макс}}$, нм	$\sum_{\text{1см}}^{1\%}$	ϵ , $\text{M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$
Тиабендазол	ДМФА	304	1173	24983
	ДМСО	305	1426	26093
Мебендазол	ДМФА	266	427	13338
		319	554	17310
	ДМСО	260	1021	27406
		322	830	22280
Альбендазол	ДМФА	268	372	10430
		301	523	14685
	ДМСО	262	638	15371
		302	751	18114

Основываясь на результатах изучения особенностей поглощения света производными бензимидазола в средах оптимальных растворителей, были разработаны методики количественного определения аналитов в субстанциях спектрофотометрическим методом и методики определения количественного содержания действующих веществ в лекарственных формах методом производной спектрофотометрии.

Значения относительной ошибки среднего результата разработанных методик – 0,78-0,99 % ($n=0,95$ $P=0,95$). Предел количественного определения составляет 0,4-2,0 мкг/мл.

Проведя анализ эффекта 51 элюента для ТСХ, установили, что подвижные фазы дихлорметан-ацетон (8:2), пропанол-2-гексан (8:2) и ацетонитрил-толуол (7:3) можно рассматривать в качестве наиболее приемлемых для проведения хроматографии в тонком слое нормальнофазового сорбента. В качестве оптимальной предложена система ацетонитрил-толуол (7:3), как способная разделить все аналиты. В качестве

оптимальной подвижной фазы для обращённофазового сорбента выбрана система ацетонитрил-вода (5:5) по результатам анализа 18 систем.

Проведено исследование особенностей хроматографирования производных бензимидазола в полупрепаративной колонке нормальнофазового сорбента при элюировании без использования дополнительного давления. Для этого применяли стеклянную колонку размерами 490×11 мм, заполненную 10 г нормальнофазового сорбента марки L 40/100 мкм. Как подвижные фазы использовались смеси дихлорметана с диметилкетон с различным соотношением компонентов, оптимальным элюентом исходя из полученных данных, можно назвать смесь дихлорметан-диметилкетон (9,5:0,5).

В ходе экспериментов находили объёмы удерживания (V_R) исследуемых веществ и объём удерживания неудерживаемого вещества (V_0). Для каждого анализируемого соединения рассчитывали значения времени удерживания (t_R), ширины пика у основания (ω), коэффициента ёмкости (k'), числа теоретических тарелок (N) по известным формулам. Результаты представлены в табл. 3.

Таблица 3

Параметры хроматографирования производных бензимидазола в колонке силикагеля L 40/100 мкм с использованием различных элюентов

Элюенты	V_0 , мл	v , мл/мин	ω , мин	V_R , мл	k'	t_R , мин	N
Тиабендазол							
Дихлорметан – диметилкетон (9,5:0,5)	4,8	0,27	88,9	29,5	5,15	109,3	24
Альбендазол							
Дихлорметан – диметилкетон (9,5:0,5)	4,8	0,27	118,5	46,2	8,63	171,1	33
Мебендазол							
Дихлорметан – диметилкетон (9,5:0,5)	4,0	0,26	29,6	27,6	5,9	106,2	206

В качестве ещё одного метода очистки был рассмотрен вариант жидкость-жидкостной экстракции. Как экстрагирующие агенты были применены н-гексан, гептан, толуол, бензол, дихлорметан, трихлорметан, этилацетат и этилацетат, насыщенный водой. Все рассматриваемые растворители являлись гидрофобными.

В ходе эксперимента смешивали раствор аналита в ДМСО с девятикратным количеством буферного раствора (рН 1,1-10,9) и добавляли органический растворитель в равном объёме. Полученную смесь в пробирке с плотно закручивающейся крышкой помещали в специальный орбитальный шейкер и экстрагировали 5 минут со скоростью 100 вращений в минуту. Органическую фазу отделяли, испаряли при комнатной температуре в токе воздуха до сухого остатка. Остаток растворяли в этилацетате. Часть полученного раствора вводили в газовый хроматограф с масс-селективным детектором. Количество вещества, выделенное из водного слоя, определяли по величине площади пика, используя уравнение градуировочного графика.

Результаты проведенных исследований показывают, что в условиях равенства объёмов контактирующих фаз ($r=1$) значения степени извлечения тиабендазола гидрофобными растворителями зависят от рН водного слоя в интервале от 1,1 до 10,9 и

составляют при экстракции н-гексаном и гептаном – менее 1%, бензолом - 22,16-22,41% (рН-7), толуолом - 21,36-21,68% (рН-7), дихлорметаном - 96,98-97,23% (рН-5), этилацетатом - 70,01-70,78% (рН-10,9), трихлорметаном - 93,08-93,21% (рН-5). этилацетатом, насыщенным водой - 65,08-65,78% (рН-10,9).

Определение производных бензимидазола методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием осуществлялось на приборе фирмы Интерлаб «Маэстро 7820» с масс-селективным детектором модели 5977В.

Хроматографировали в колонке НР – 5MS диаметром 0,25 мм и длиной 30 м с неподвижной фазой (5%-фенил)метилполисилоксан (толщина слоя 0,25 мкм). Начальная температура термостата – 100°C с изотермической выдержкой 1 мин, с последующим температурным градиентом 35°C в мин до 300°C с изотермической выдержкой при конечной температуре 15 мин. Подвижная фаза – гелий марки «А». Температура испарителя – 270°C, устройства сопряжения с детектором – 280°C, квадруполя – 150°C, источника ионов – 230°C. Пробу вводили без деления потока. Регистрировали масс-спектры по полному ионному току через 3 мин после ввода пробы (диапазон – от 41 до 650 атомных масс). Время анализа – 16,7 мин. Ионизация – электронный удар с энергией 70 эВ. Как свидетельствуют эти данные, значения времени удерживания тиабендазола и альбендазола составляют соответственно 7,46 мин и 8,841 мин. Мебендазол определить в подобных условиях не удавалось.

Для повышения селективности и чувствительности идентификации производных бензимидазола методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием были рассмотрены варианты получения триметилсилильных (нагревание при 70°C; среда этилацетата) и ацетильных (нагревание при 135-139°C; среда уксусного ангидрида) производных тиабендазола, альбендазола и мебендазола по приводимым ранее схемам. Результаты представлены на рис. 1-3.

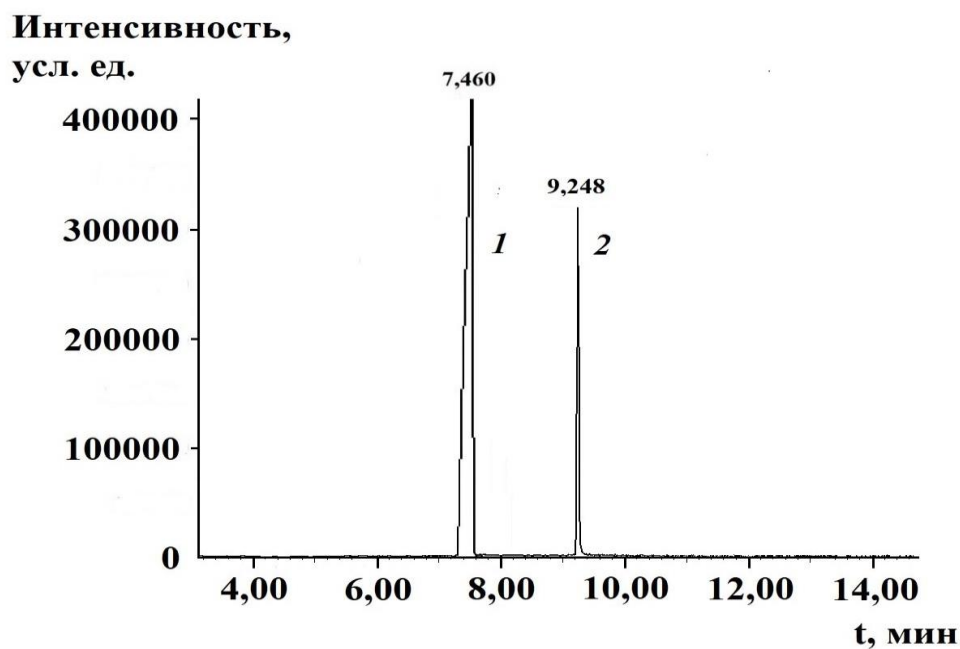


Рисунок 1 – Газовая хроматограмма тиабендазола (1) и его ТМС-производного (2)

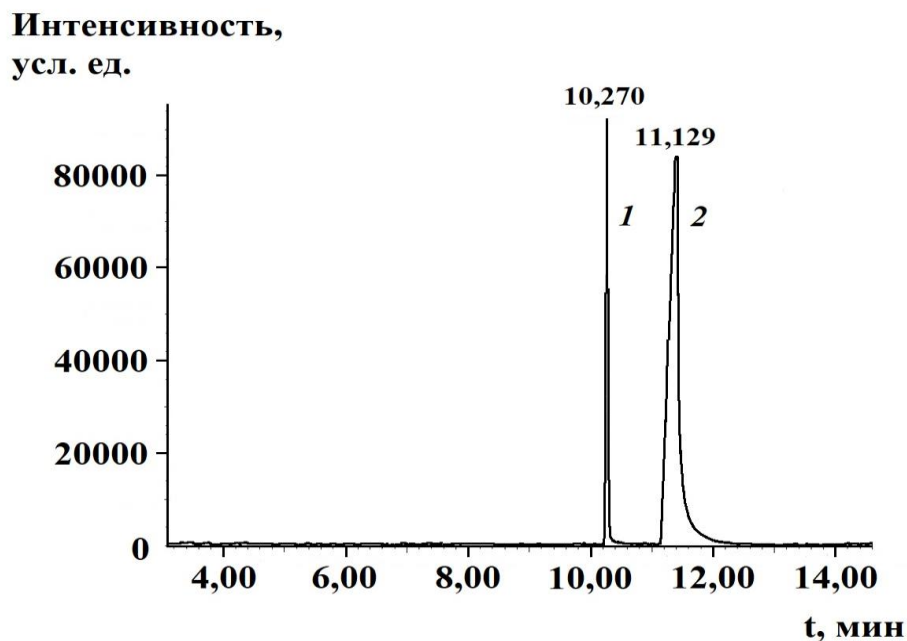


Рисунок 2 – Газовая хроматограмма ТМС - (1) и ацетильного (2) дериватов мебендазола

Дериватизация производных бензимидазола обеспечила получение их летучих и стабильных производных. Это, в частности, позволило идентифицировать мебендазол методом ГХ-МС. Введение в структуру молекул изучаемых соединений триметилсилильных и ацетильных радикалов привело к повышению хроматографических и масс-спектральных характеристик, вследствие чего повысились чувствительность и специфичность анализа.

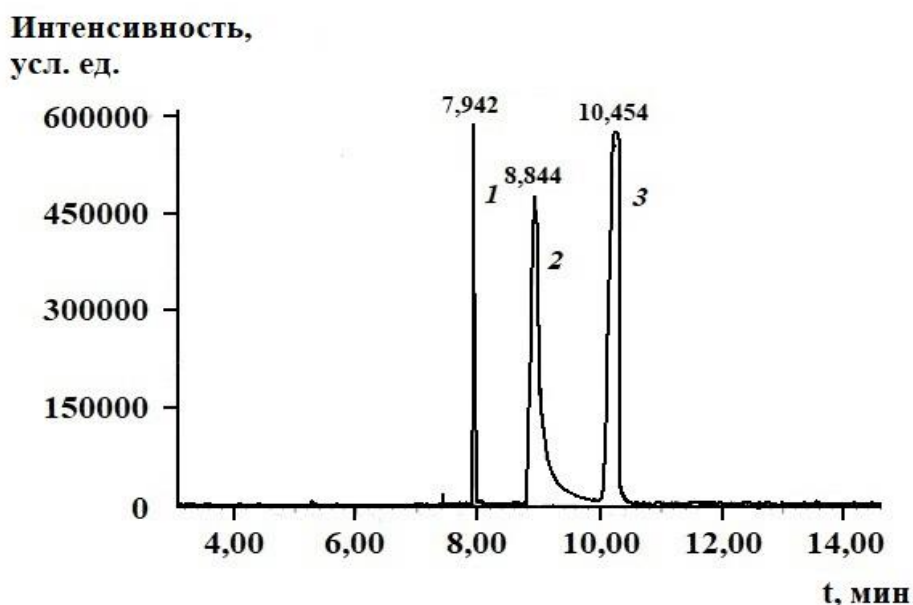


Рисунок 3 – Газовая хроматограмма триметилсилильного производного альбендазола (1) альбендазола (2) и его ацетильного производного (3)

На основе проведённых исследований разработаны методики определения количественного содержания производных бензимидазола непосредственно и в виде их дериватов методом ГХ-МС. Значения относительной ошибки среднего результата

разработанных методик – 0,96-1,31 % ($n=0,95$ $P=0,95$). Предел количественного определения составляет 0,08-0,1 нг.

Для идентификации анализов также применяли метод ВЭЖХ с tandemной масс-спектрометрией. Исследование осуществлялось на жидкостном хроматографе с масс-спектрометром типа «ионная ловушка» модели amaZon speed.

Хроматографировали в колонке Intensity Solo 2 C18 (100×2,1 мм). Элюирующий агент А – вода для жидкостной хроматографии (деионизированная) с содержанием ацетонитрила и муравьиной кислоты 0,1% и аммония формиата 5 мМ, элюирующий агент Б – ацетонитрил для ВЭЖХ с содержанием воды деионизированной, кислоты муравьиной 0.1% и формиата аммония 5 мМ. Режим элюирования: 0 мин – 1% Б, затем увеличение элюента Б с 1 по 8 мин до 99% и выдерживание до 9 мин, затем уменьшение элюента Б до 1% 9 по 10 мин и далее выдерживание элюента Б – в 1% до окончания анализа (11 мин). Температура колонки – 40°C, скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин, объем вводимой пробы – 5 мкл. Вариант ионизации – протонирование молекулы с помощью электроспрея.

Регистрация хроматограммы и масс-спектров первого, второго и третьего порядков осуществлялась в диапазоне от 70 до 3000 атомных масс, со скоростью 32,500 атомных масс в секунду. Полученные данные сравнивали с библиотечными (библиотека масс-спектров MWW: Maurer/Wissenbach/Weber LC-MSⁿ library of Drugs, Poisons, and Their Metabolites. May 2019) с учетом времени удерживания выявленных компонентов. Полученные результаты представлены на рис. 4-7.

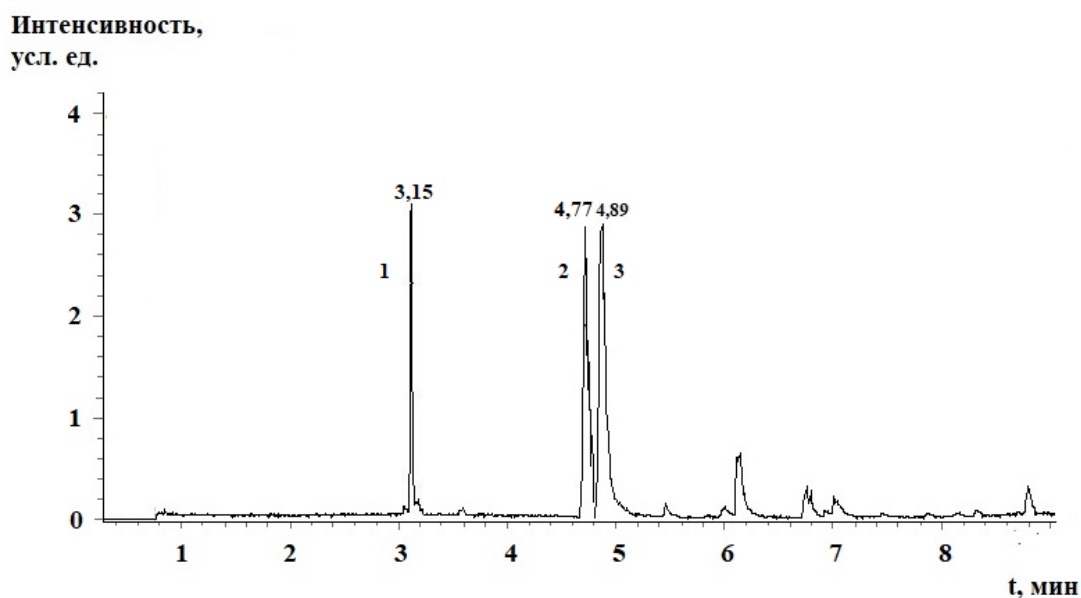


Рисунок 4 – Жидкостная хроматограмма тиабендазола (1) мебендазола (2) и альбендазола (3)

Как показывают данные, полученные после обработки, значения времени удерживания мебендазола, тиабендазола и альбендазола составляют соответственно 4,77 мин, 3,15 мин и 4,89 мин.

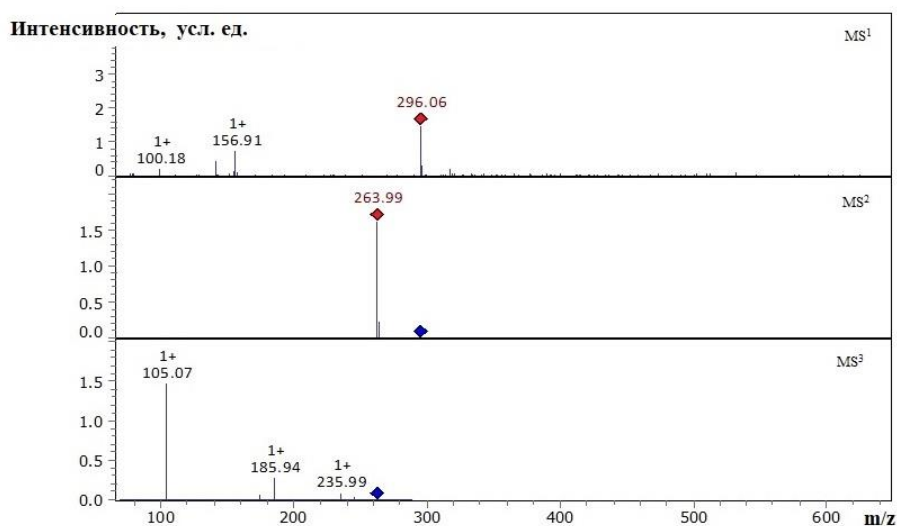


Рисунок 5 – Масс-спектры мебендазола первого, второго и третьего порядков

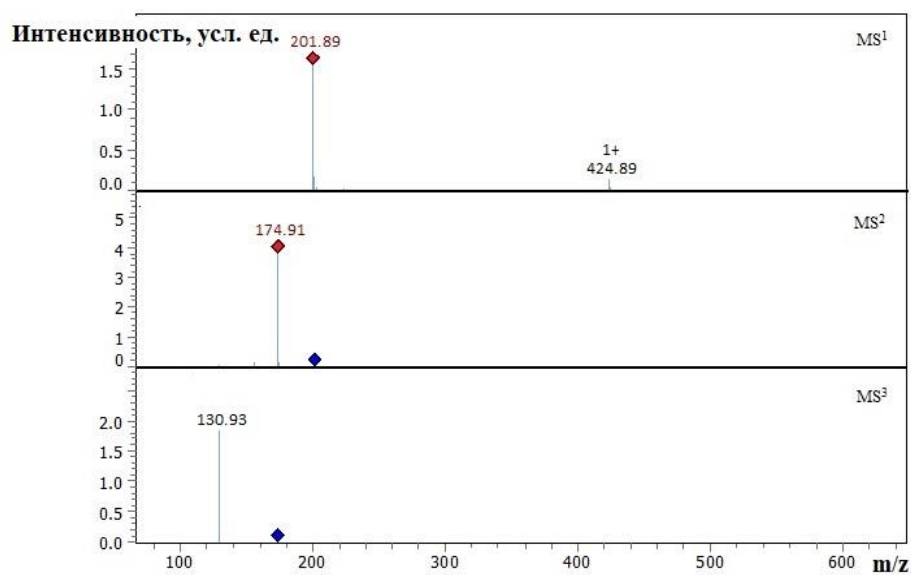


Рисунок 6 – Масс-спектры тиабендазола первого, второго и третьего порядков

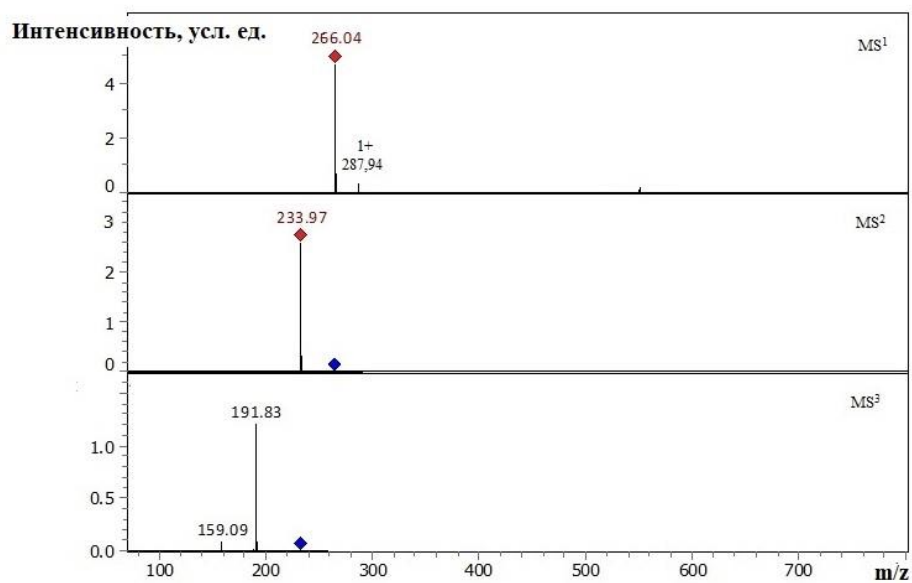


Рисунок 7 – Масс-спектры альбендазола первого, второго и третьего порядков

Характерные значения интенсивности масс осколков молекул в спектрах различного порядка и значения времен удерживания на жидкостных хроматограммах позволяют с высокой селективностью идентифицировать исследуемые соединения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Предел обнаружения производных бензимидазола – 0,08-0,1 пг в хроматографируемой пробе.

Изучена способность изолировать производные бензимидазола рядом жидкостей различной химической природы. Для определения оптимального изолирующего агента готовили модельные смеси объектов исследования с биоматериалом в соотношении 25 мг анализа на 25 г мелкоизмельченной трупной печени (размер частиц 0,2 - 0,5 см), тщательно перемешивали и выдерживали 90 мин при комнатной температуре.

Каждую модельную смесь, подвергали настаиванию с соответствующим растворителем в количестве, превышающем массу смеси в два раза, двукратно по 45 минут. Изоляты объединяли и очищали фильтрованием. Точное количество фильтрата хроматографировали одновременно с веществом-свидетелем, используя стеклянные камеры (внутренний объем – 600 см³) и смесь ацетонитрил-толуол (7:3) в качестве подвижной фазы, в тонком слое сорбента на пластинах «Сорбфил» ПТСХ-АФ-А-УФ. Детекцию проводили УФ-облучением, далее участок пластины с пятном анализа, совпадающий по величине R_f, с веществом-свидетелем, вырезали и элюировали определённым количеством ДМСО (тиабендазол и мебендазол) или ДМФА (альбендазол). Оптические плотности элюатов измеряли на спектрофотометре СФ-56 в кюветах из кварцевого стекла (длина оптического пути 10 мм) при 305 нм, 322 нм и 301 нм соответственно для оценки количественного содержания анализов.

В описанных выше условиях сохраняли образцы печени, в которых отсутствовали анализы (контрольные образцы) и исследовали аналогичным образом.

Результаты сравнительного изолирования производных бензимидазола (n=5) представлены на рис. 8-10.

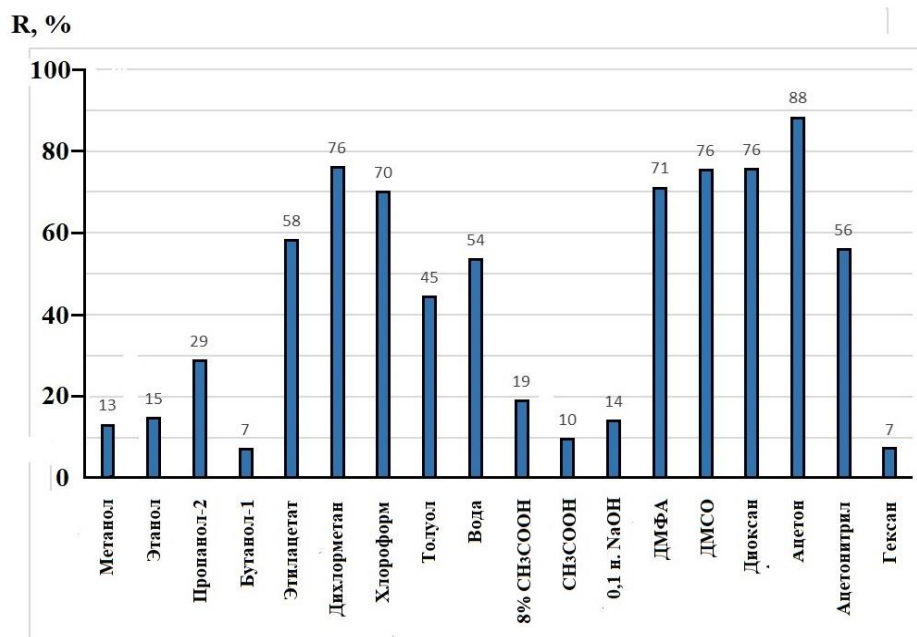


Рисунок 8 – Результаты сравнительного изолирования тиабендазола из биологического материала

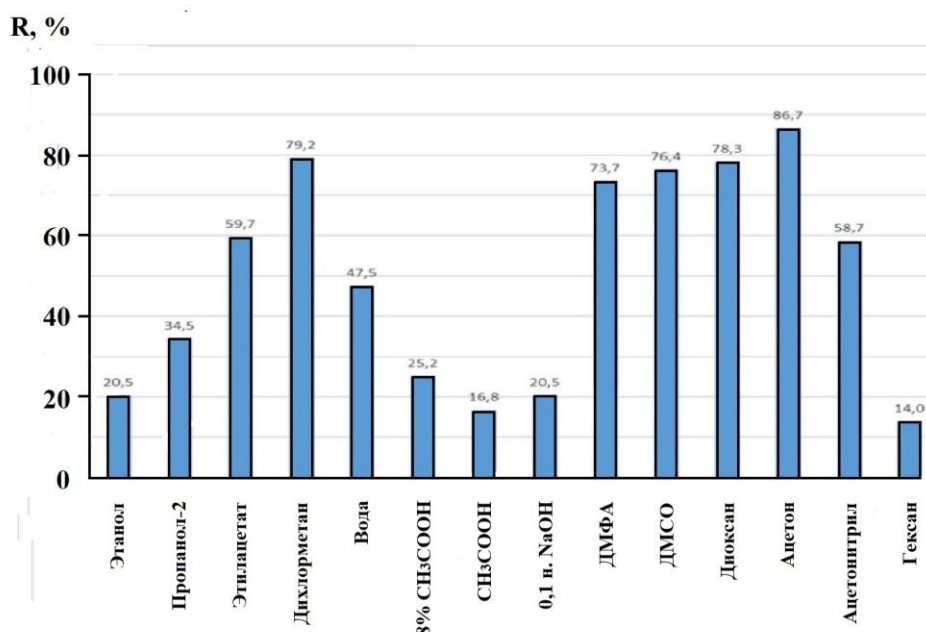


Рисунок 9 – Результаты сравнительного изолирования альбендазола из биологического материала

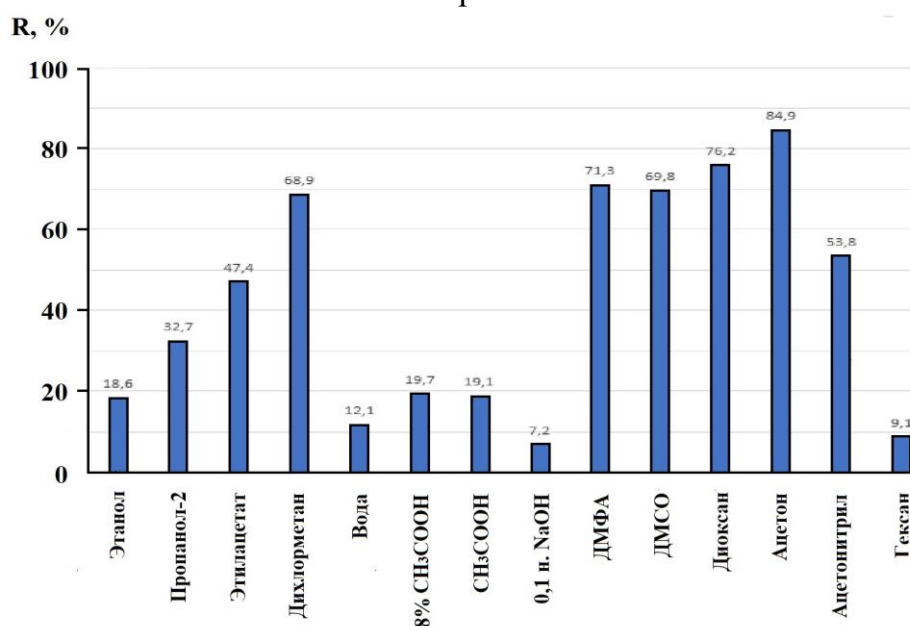


Рисунок 10 – Результаты сравнительного изолирования мебендазола из биологического материала

Результаты проведенных исследований показывают, что наибольшие значения извлечения тиабендазола, альбендазола и мебендазола из биологического материала достигаются с использованием диметилкетона - 88,7%, 86,7%, и 84,9%, дихлорметана – 76,3%, 79,2% и 68,9% и ДМСО – 76,3%, 76,4% и 69,8% соответственно.

Далее были определены оптимальные условия изолирования и выяснено, что извлечение аналитов из биологических тканей при двукратном настаивании с диметилкетонном на протяжении не менее 30 мин каждое, при том, что масса диметилкетона превышает массу биоматериала в два раза, является оптимальным.

Разработаны методики определения производных бензимидазола в биологическом материале. Методика на основе изолирования диметилкетонотом и очистки в колонке нормальнофазового сорбента позволяет определять в печени $86,76-91,22 \pm 1,94-3,49\%$, в крови – $87,91-91,12 \pm 1,89-3,37\%$, в плазме – $89,82-94,78 \pm 1,80-3,09\%$ производных бензимидазола. Методика, на основе изолирования диметилкетонотом и очистки экстракцией и колоночной нормальнофазовой хроматографией позволяет определять в печени $83,35-88,29 \pm 2,25-3,91\%$, в крови – $85,05-88,42 \pm 2,20-3,88\%$, в плазме – $86,58-91,78 \pm 2,08-3,42\%$ исследуемых аналитов.

Были проведены валидационные мероприятия в отношении методик определения рассматриваемых производных бензимидазола в различных биоматрицах после изолирования диметилкетонотом и очистки сочетанием экстракции и колоночной хроматографии. Процесс валидации предлагаемых методик осуществлялся по позициям линейности, селективности, стабильности, правильности и прецизионности в соответствии с нормативными требованиями, принятыми в области биологического и судебно-химического анализа. Итогом валидационных мероприятий явилось подтверждение соответствия разработанных схем определения ряда производных бензимидазола в биоматрицах требованиям, принятым для судебно-химических методик. Коэффициент корреляции (r) во всех случаях оказался выше 0,95, а средние значения оптической плотности при оценке стабильности не выходили за пределы 5 %.

Значения пределов обнаружения аналитов в ткани печени, крови и моче составляют соответственно 0,24-1,0, 0,2-0,8 и 0,12-0,4 мкг/г, пределов количественного определения – 0,4-2,0 мкг/г.

Проведено изучение сохраняемости производных бензимидазола в биологическом материале при трех температурных режимах: 0-2°C, 18-24°C, 36-37°C.

Результаты представлены на рис. 11-13.

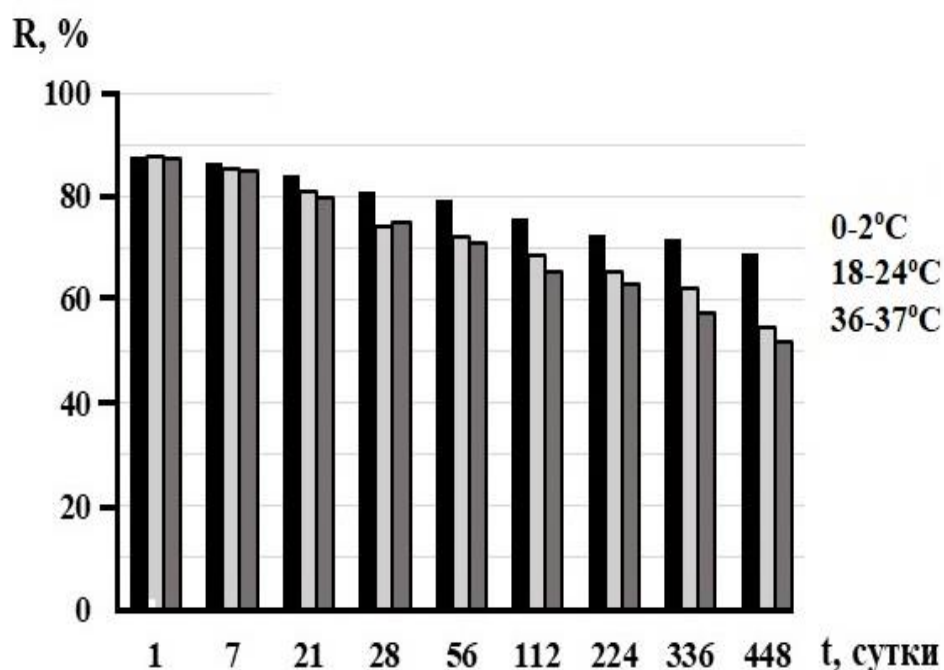


Рисунок 11 – Результаты изучения сохраняемости тиабендазола в модельных смесях с гнилостно разлагающейся тканью трупной печени

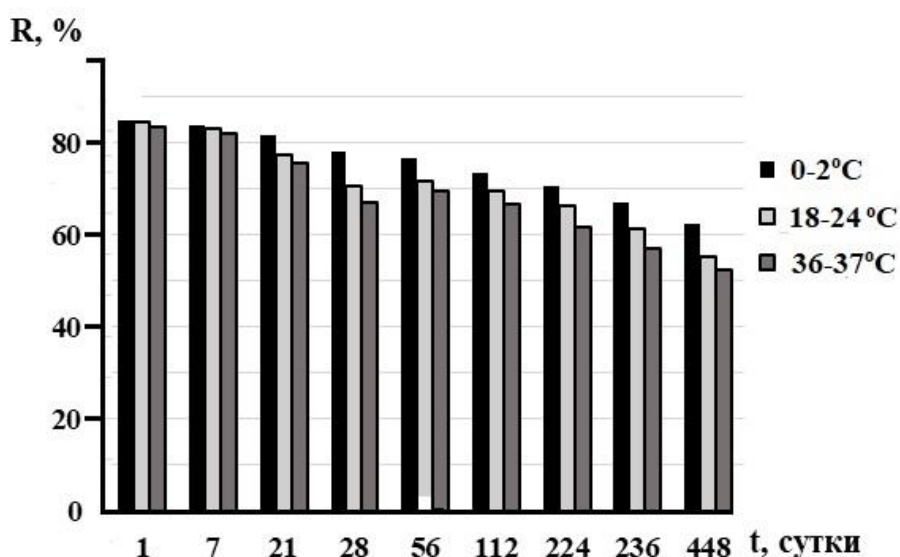


Рисунок 12 – Результаты изучения сохраняемости альбендазола в модельных смесях с гнилостно разлагающейся тканью трупной печени

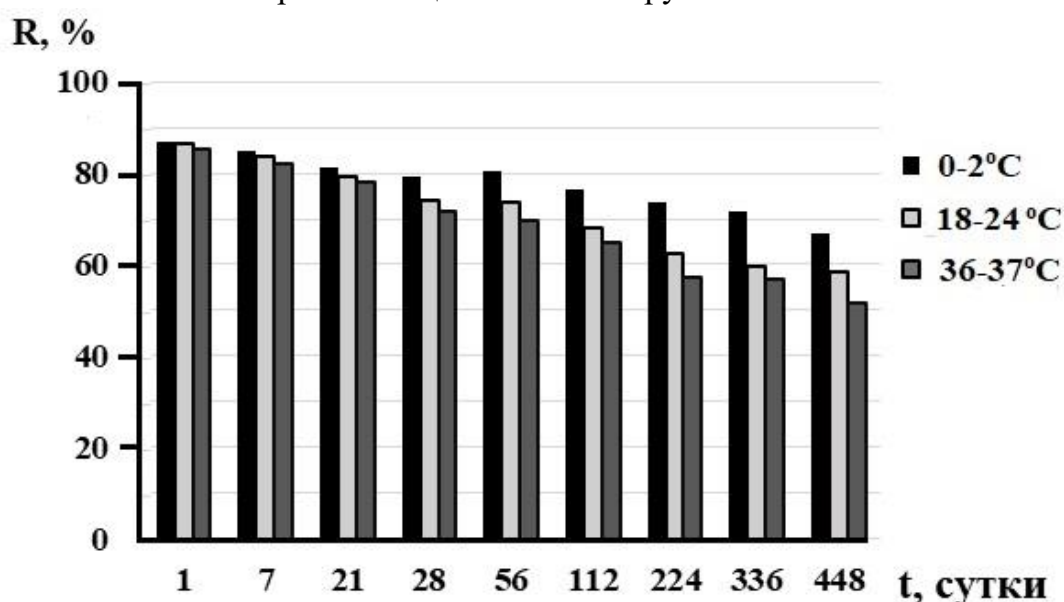


Рисунок 13 – Результаты изучения сохраняемости мебендазола в модельных смесях с гнилостно разлагающейся тканью трупной печени

Как свидетельствуют полученные данные, тиабендазол, альбендазол и мебендазол являются достаточно стабильными веществами и могут быть обнаружены в гнилостно разлагающемся биологическом материале, сохраняемом в диапазоне температур 0-37°C в течение 448 суток.

Для изучения распределения каждого из производных бензимидазола в организме теплокровных животных, как модельные теплокровные организмы рассматривались белые лабораторные крысы породы Wistar. Из этих крыс формировали 5 опытных групп и одну контрольную группу, каждая из которых включала 5 особей. Животным опытных групп вводили в желудок с помощью зонда водную суспензию половинной летальной дозы того или иного анализа. Результаты исследования представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты количественного определения производных бензимидазола в биоматрицах отравленных организмов (лабораторные крысы)

Биоматрицы	Найдено, мг в 100 г биоматрицы		
	тиабендазола	мебендазола	альбендазола
Печень	$\bar{x} = 52,26$; $S = 5,96$ $S_{\bar{x}} = 2,67$; $\Delta\bar{x} = 7,41$ $S_r, \% = 11,40$	$\bar{x} = 25,39$; $S = 2,56$ $S_{\bar{x}} = 1,14$; $\Delta\bar{x} = 3,18$ $S_r, \% = 10,07$	$\bar{x} = 34,72$; $S = 2,65$ $S_{\bar{x}} = 1,18$; $\Delta\bar{x} = 3,29$ $S_r, \% = 7,62$
Почки	$\bar{x} = 21,76$; $S = 2,03$ $S_{\bar{x}} = 0,91$; $\Delta\bar{x} = 2,52$ $S_r, \% = 9,32$	$\bar{x} = 14,46$; $S = 1,80$ $S_{\bar{x}} = 0,81$; $\Delta\bar{x} = 2,24$ $S_r, \% = 12,46$	$\bar{x} = 25,14$; $S = 2,16$ $S_{\bar{x}} = 0,97$; $\Delta\bar{x} = 2,69$ $S_r, \% = 8,61$
Селезёнка	$\bar{x} = 18,44$; $S = 1,43$ $S_{\bar{x}} = 0,64$; $\Delta\bar{x} = 1,78$ $S_r, \% = 7,76$	$\bar{x} = 12,15$; $S = 0,55$ $S_{\bar{x}} = 0,25$; $\Delta\bar{x} = 0,68$ $S_r, \% = 4,50$	$\bar{x} = 29,81$; $S = 3,35$ $S_{\bar{x}} = 1,50$; $\Delta\bar{x} = 4,17$ $S_r, \% = 11,25$
Легкие	$\bar{x} = 7,23$; $S = 0,66$ $S_{\bar{x}} = 0,30$; $\Delta\bar{x} = 0,82$ $S_r, \% = 9,12$	$\bar{x} = 4,16$; $S = 0,45$ $S_{\bar{x}} = 0,20$; $\Delta\bar{x} = 0,56$ $S_r, \% = 10,83$	$\bar{x} = 11,19$; $S = 0,68$ $S_{\bar{x}} = 0,31$; $\Delta\bar{x} = 0,85$ $S_r, \% = 6,11$
Кровь	$\bar{x} = 6,41$; $S = 0,31$ $S_{\bar{x}} = 0,14$; $\Delta\bar{x} = 0,38$ $S_r, \% = 4,77$	$\bar{x} = 3,21$; $S = 0,20$ $S_{\bar{x}} = 0,09$; $\Delta\bar{x} = 0,25$ $S_r, \% = 6,26$	$\bar{x} = 5,02$; $S = 0,43$ $S_{\bar{x}} = 0,19$; $\Delta\bar{x} = 0,54$ $S_r, \% = 8,57$
Тонкий кишечник с содержимым	$\bar{x} = 44,86$; $S = 5,94$ $S_{\bar{x}} = 2,66$; $\Delta\bar{x} = 7,39$ $S_r, \% = 13,25$	$\bar{x} = 118,58$; $S = 12,28$ $S_{\bar{x}} = 5,49$; $\Delta\bar{x} = 15,27$ $S_r, \% = 10,36$	$\bar{x} = 72,91$; $S = 4,80$ $S_{\bar{x}} = 2,15$; $\Delta\bar{x} = 5,97$ $S_r, \% = 6,59$
Желудок с содержимым	$\bar{x} = 920,63$; $S = 91,17$ $S_{\bar{x}} = 40,77$; $\Delta\bar{x} = 113,35$ $S_r, \% = 9,90$	$\bar{x} = 861,34$; $S = 68,49$ $S_{\bar{x}} = 30,63$; $\Delta\bar{x} = 85,16$ $S_r, \% = 7,95$	$\bar{x} = 612,05$; $S = 84,31$ $S_{\bar{x}} = 42,18$; $\Delta\bar{x} = 117,25$ $S_r, \% = 15,41$
Скелетные мышцы	$\bar{x} = 16,85$; $S = 1,19$ $S_{\bar{x}} = 0,53$; $\Delta\bar{x} = 1,48$ $S_r, \% = 7,06$	$\bar{x} = 9,35$; $S = 0,76$ $S_{\bar{x}} = 0,34$; $\Delta\bar{x} = 0,94$ $S_r, \% = 8,09$	$\bar{x} = 14,71$; $S = 1,58$ $S_{\bar{x}} = 0,71$; $\Delta\bar{x} = 1,96$ $S_r, \% = 10,72$
Сердце	$\bar{x} = 7,49$; $S = 0,51$ $S_{\bar{x}} = 0,23$; $\Delta\bar{x} = 0,72$ $S_r, \% = 6,87\%$	$\bar{x} = 11,22$; $S = 1,17$ $S_{\bar{x}} = 0,52$; $\Delta\bar{x} = 1,45$ $S_r, \% = 10,39\%$	$\bar{x} = 18,53$; $S = 0,84$ $S_{\bar{x}} = 0,37$; $\Delta\bar{x} = 1,04$ $S_r, \% = 4,51\%$

Содержание таблицы показывает, что рассматриваемые производные бензимидазола в большей степени обнаруживаются (мг/100 г) в желудке с содержимым (612,05-920,63±85,16-117,25), тонком кишечнике с содержимым (44,86-118,58±5,97-15,27), печени (25,39-52,26±3,18-7,41), почках (14,46-25,14±2,24-2,69) и селезенке (12,15-29,81±0,68-4,17) подопытных крыс. В меньшей степени тиабендазол, мебендазол и альбендазол присутствуют в скелетных мышцах, сердце, лёгких и крови животных, подвергшихся отравлению.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Предложены условия получения и очистки ряда аналитических форм (триметилсилильные и ацетильные дериваты) тиабендазола, альбендазола и мебендазола. Показана индивидуальность полученных веществ посредством ГХ-МС и ТСХ, подтверждена предполагаемая структура дериватов с использованием методов ГХ-МС и ИК-спектрофотометрии. Разработаны варианты количественного определения триметилсилильных и ацетильных производных изучаемых соединений методом ГХ-МС.

2. Представлена возможность определения производных бензимидазола методами УФ-спектрофотометрии, ГХ-МС, ВЭЖХ-МС/МС. Изучено хроматографическая подвижность производных бензимидазола в тонком слое нормально- и обращеннофазного сорбентов с использованием подвижных фаз различной полярности. Рассчитаны основные хроматографические параметры. Таким образом при определении производных бензимидазола методом ТСХ на пластинах «Sorbfil» с нормальной фазой оптимальной является подвижная фаза ацетонитрил-толуол (7:3), а для обращеннофазового привитого (C14-C15) сорбента подвижная фаза ацетонитрил-вода (5:5) является оптимальной. Рассмотрен вариант газовой хроматографии триметилсилильных и ацетильных производных тиабендазола, альбендазола и мебендазола с масс-селективным детектированием.

3. Разработаны методики определения количественного содержания производных бензимидазола методом спектрофотометрии в среде ДМСО и ДМФА, а также методом производной спектрофотометрии второго порядка в среде этих же растворителей. Значения относительной ошибки среднего результата разработанных методик – 0,78-0,99 % ($n=0,95$ $P=0,95$). Предел количественного определения составляет 0,4-2,0 мкг/мл.

Разработаны методики определения количественного содержания производных бензимидазола непосредственно и в виде их дериватов методом ГХ-МС. Значения относительной ошибки среднего результата разработанных методик – 0,96-1,31 % ($n=0,95$ $P=0,95$). Предел количественного определения составляет 0,08-0,1 нг.

4. Для очистки производных бензимидазола изучена возможность применения жидкость-жидкостной экстракции и полупрепаративной колоночной хроматографии. Выявлено, что наилучшими условиями экстрагирования производных бензимидазола из водных растворов являются: экстрагент дихлорметан, насыщение водной фазы натрия хлоридом, значение рН водной фазы 5,02. Оптимальные условия хроматографирования анализов в колонке сорбента L 40/100 мкм достигаются при использовании подвижной фазы дихлорметан-диметилкетон (9,5:0,5). Предложены схемы очистки производных бензимидазола методом колоночной хроматографии обычного давления и её сочетанием с жидкость-жидкостной экстракцией. Установлена степень эффективности очистки анализов по предлагаемым схемам.

5. Проведено изучение сравнительного изолирования производных бензимидазола из биоматриц посредством настаивания с различными органическими и неорганическими жидкостями. Выявлено, что лучшим извлекающим агентом по результатам исследования может быть назван диметилкетон. Определены и обоснованы

оптимальные условия изолирования тиабендазола, альбендазола и мебендазола из биоматриц диметилкетонем: двукратное массовое превосходство количества изолирующего агента над количеством биоматериала при двукратном настаивании не менее чем 30 мин каждое.

6. Разработаны методики определения производных бензимидазола в биоматериале методами спектрофотометрии и ГХ-МС после изолировании диметилкетонем и очистки в колонке нормальнофазового сорбента или путём жидкость-жидкостной экстракции и колоночной нормальнофазовой хроматографии. Они позволяют определять в печени $83,35-91,52 \pm 1,94-4,12\%$, в цельной крови $85,05-91,43 \pm 1,89-4,09\%$, в плазме крови $86,58-94,99 \pm 1,80-3,57\%$ производных бензимидазола.

Проведена валидация разработанных методик. Определены пределы обнаружения производных бензимидазола в ткани печени, крови и моче составляют $0,02-1,0$, $0,015-0,8$ и $0,01-0,4$ мкг/г соответственно, для количественного определения предел – $0,03-2,0$ мкг/г. Методики отвечают требованиям стабильности, селективности, линейности, прецизионности и правильности.

7. Изучена сохраняемость производных бензимидазола при различных температурах в диапазоне $0-37^{\circ}\text{C}$ с применением модельных смесей аналита с тканью трупной печени в гнилостно разлагающемся биологическом материале. Установлено, что тиабендазол, альбендазол и мебендазол являются достаточно стабильными веществами и могут быть обнаружены в гнилостно разлагающемся биологическом материале по крайней мере в течение 448 суток.

Исследован характер распределения выбранных производных бензимидазола у теплокровных (модель – белые крысы породы Wistar) по результатам однократного введения им ЛД₅₀ аналитов в желудок.

Выявлено, что количества (мг/100 г) производных бензимидазола обнаруживаются в следующих органах: желудок с содержимым ($612,05-920,63 \pm 85,16-117,25$), тонкий кишечник с содержимым ($44,86-118,58 \pm 5,97-15,27$), печень ($25,39-52,26 \pm 3,18-7,41$), почки ($14,46-25,14 \pm 2,24-2,69$) и селезенка ($12,15-29,81 \pm 0,68-4,17$).

Рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы: По итогам проведенных исследований предложено 2 варианта общей схемы исследования биологического материала на наличие в нем тиабендазола, альбендазола и мебендазола, каждая из которых позволяет изолировать, очистить, идентифицировать и количественно определить исследуемые вещества. Данные схемы могут быть использованы при химико-токсикологическом и судебно-химическом определении потенциального отравления данными соединениями в медицинских организациях.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Шорманов, В.К. Определение альбендазола в условиях химико-токсикологического анализа / В.К. Шорманов, Д.П. Щербаков // Научно-практический журнал «Вестник современной клинической медицины». – 2018. – Т 11, вып. 3. – С. 44-50.

2. Шорманов, В.К. Определение тиабендазола в условиях химико-токсикологического анализа биоматериала / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Судебно-медицинская экспертиза. – 2021. – Т. 64, № 3. – С. 34-40.

3. Шорманов, В.К. Особенности определения альбендазола и динамики его разложения в биологическом материале / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков**, С.Ю. Гармонов // Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки. – 2021. – Т. 163, кн. 2. – С. 209-220.

4. Шорманов, В.К. Применение производных спектров второго порядка для оценки содержания мебендазола в таблетках / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2017. – № 4. – С. 120-124.

Патенты:

5. Патент № 2692127 Российская Федерация. Способ определения N-(бензилимидазоллил-2)-О-метилкарбамата в биологическом материале / В.К. Шорманов, Е.А. Коваленко, **Д.П. Щербаков**, И.М. Жуков // заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – № 2018124459; Заявл. 03.07.2018; Опубл. 21.06.2019. – БИ. – 2019. – № 18. – 12 с.

Статьи в сборниках научных трудов и материалов конференций:

6. Шорманов, В.К. Определение альбендазола в биоматериале / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Новшества в медицине и фармакологии: сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. Вып. 2 (Тюмень, 25 декабря 2017 г.). – Тюмень, 2017. – С. 26-28.

7. Шорманов, В.К. Определение мебендазола в крови / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Современная медицина: актуальные вопросы и перспективы развития: сборник научных трудов по итогам IV международной научно-практической конференции (Уфа, 11 сентября 2017 г.). – Уфа, 2017. – С. 59-61.

8. Шорманов, В.К. Определение тиабендазола в биологическом материале с применением экстракционных методов / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии: материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием (Краснодар, 07–13 октября 2018 г.). – Краснодар, 2018. – С. 88.

9. Шорманов, В.К. Применение производных спектров второго порядка для оценки содержания альбендазола в таблетках / В.К. Шорманов, **Д.П. Щербаков** // Человек и лекарство: тезисы докладов XXIV Российского национального конгресса (Москва, 10-13 апреля 2017 г.). – Москва, 2017. – С. 189.

10. **Щербаков, Д.П.** Применение производной спектрометрии для определения тиабендазола в биоматериале / **Д.П. Щербаков** // Молодежная наука и современность: материалы 83-ей Всероссийской научной конференции студентов и молодых ученых с международным участием, посвященной 83-летию КГМУ и 85-летию со дня рождения члена-корреспондента РАМН, профессора А.В. Завьялова. Ч. 2 (Курск, 18-19 апреля 2018 г.). – Курск, 2018. – С. 314.