

### Оптимизация определения действующих веществ в инсекто-родентицидных средствах на основе фипронила с производными 4-гидроксикумарина методом ОФ ВЭЖХ

Носикова Л. А.<sup>1,2</sup>, Кочетов А. Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М. В. Ломоносова), Россия 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

<sup>2</sup> ФГБУН Институт физической химии и электрохимии им. А. Н. Фрумкина (ИФХЭ) РАН: 119991, Россия, г. Москва, Ленинский пр., 31.

E-mail: kochchem@mail.ru

Рассмотрены примеры совместного определения фипронила (инсектицид фенилпирозолонового ряда) и бромадиолон (антикоагулянтный родентицид 4-гидроксикумаринового ряда) методом ОФ ВЭЖХ. Осуществлена оптимизация условий экстракционного извлечения различных препаративных форм на основе этих действующих веществ, включая твердые и мягкие брикеты, содержащие в качестве матриц пищевые компоненты и парафин. Обсуждаются возможность и целесообразность оценки изомерного состава титульных производных. Найденные условия хроматографического определения в изократическом режиме открывают широкие возможности как для гармонизации методов анализа других инсекто-родентицидных средств на основе гомологов 4-гидроксикумаринового ряда, так и для осуществления процедуры оценки поставщиков или установления факта фальсификации продукции.

Ключевые слова: фипронил, зоокумарин, куматетралил, бромадиолон, дифенакум, флокумафен, бродифакум, ОФ ВЭЖХ, оценка поставщиков, фальсификат, варфарин, цис-, транс-, «изометры», инсекто-родентицид.

#### Введение

Инсекто-родентицидные средства разработаны для пресечения путей распространения инфекций, которые переносятся и грызунами, и паразитирующими на них насекомыми, представляя повышенную эпидемическую опасность для человека. В настоящее время инсекто-родентицидные средства должны проходить процедуру обязательной государственной регистрации. Их можно условно разделить на две группы: 1) контактные средства – это клеевые ловушки [1], фиксирующие на поверхности насекомых и зверьков; 2) различные виды приманок, в состав которых входит высокоактивный инсектицид, действующий через кровь грызуна, и родентицид, уничтожающий зверьков через несколько суток с момента поедания отравленной приманки [2]. В настоящее время на территории РФ зарегистрированы 12 клеевых и 8 приманочных форм [3] инсекто-родентицидных средств. Во всех приманочных средствах в качестве родентицидов при-

меняются антикоагулянты подгруппы 4-гидроксикумарина, в качестве инсектицидов в половине средств используется фипронил (реже имидаклоприд и ацетамиприд). За долгое время использования инсектицидных и родентицидных средств сложились устойчивые подходы в оценке титульных производных. Тем более удивительно, что не существует совместного метода их определения в уже существующих, а также тех, которые появятся в будущем инсекто-родентицидных средствах. Целью данной работы являлось создание универсального хроматографического метода, который позволил бы не только идентифицировать инсекто-родентицидные средства, но и рассматривать их на предмет подлинности путем установления изомерного состава субстанций и, как следствие, оценивать поставщиков сырья.

#### Материалы и методы

Для проведения исследований использовали следующие аналитические стандарты: Фипро-

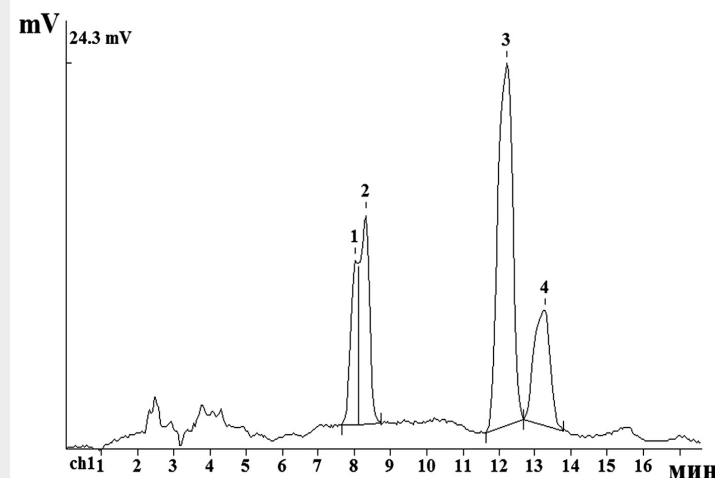
нил 97,3% (ГСО 8629-2004, НПК «Блок-1», Россия), Дифенакум 99,2% (Fluka, Англия), Варфарин 97,5% (СОП 64-06, НПК «Блок-1», Россия), Бродифакум 97,8% (СОП 68-06, НПК «Блок-1», Россия), Бромадиолон 98,2% (СОП 65-06, НПК «Блок-1», Россия), Куматетралил 99,9% (Bayer AG, Германия), Флокумафен 98,0% (Waycome Pharmaceutical Co., Ltd, Китай). Использовали следующие реагенты и сольвенты: изопропанол (х. ч., ГОСТ 18300-87), хлороформ (х. ч., ТУ 6-09-06-4263), ацетон (для хроматографии ТУ СОМР 2-044-96), 1,4-диоксан (ч. д. а., ГОСТ 10455-80), уксусная кислота (х. ч., ГОСТ 61-75), вода дистиллированная (ГОСТ 6709-72), ацетонитрил (для ВЭЖХ, Panreac, Испания) без предварительной очистки.

Проведение ВЭЖХ в сочетании с УФ-детектированием осуществляли на хроматографе Waters 490 (Waters Ltd., Watford, UK), оснащенном насосом Altex модели 110А, инжектором Rheodyne с объемом петли 20 мкл, УФ-детектором модели 490 с переменной длиной волны. Использовали две колонки из нержавеющей стали: одна – 4,0×150 мм, заполненная Сепарон SGX C18 Супер (RP-S), зернение 5 мкм (Элсико, Россия); вторая – 4,6×150 мм, заполненная Reprosil ODS-A, зернение 5 мкм (Элсико, Россия). Подвижная фаза предварительно дегазировалась при помощи ультразвуковой установки, скорость потока при элюировании – 0,5 мл/мин, соотношение компонентов указано в подписи к рис. 1,2. Детектирование осуществляли при 280 нм (температура комнатная). Запись хроматограмм проводили с помощью программы Мультихром (Ampersand Ltd. версия 1.52i, Россия).

В процессе работы готовили премиксы анализируемых субстанций в хлороформе с концентрациями 5–10 мг/мл. Разбавлением премиксов изопропанолом до концентраций 0,02–0,30 мг/мл удалось получить стабильные рабочие растворы (хранение 3 месяца в холодильнике  $T = 2-6^{\circ}\text{C}$ ) для аналитического определения методом ОФ ВЭЖХ с широким охватом полярностей подвижной фазы. Растворы с концентрациями ниже 0,02 мг/мл готовили непосредственно перед использованием.

В процессе исследования было проверено на содержание действующих веществ средство ФИПРАТ АЛТ (ООО «Валбрента Кемикалс», Россия) в виде тестовой приманки и твердых парафинированных брикетов.

Перед хроматографическим определением действующих веществ (фипронил, бромадиолон) в приманке на основе теста пробоподготов-

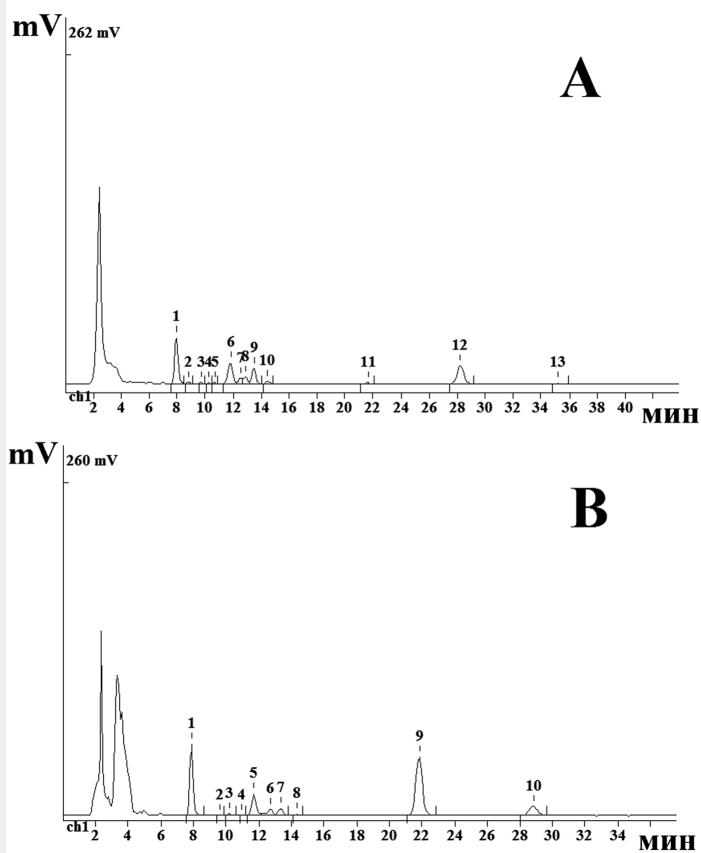


**Рис. 1.** Хроматограмма модельного раствора фипронила 0,010 мг/мл из ГСО – (пики 1, 2) и бромадиолона 0,010 мг/мл из ГСО – (пики 3, 4). Колонка 4,6×150 мм Reprosil ODS-A, 5 мкм. Система  $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$  (70: 30: 1);  $\lambda = 280 \text{ нм}$ ; 0,5 мл/мин.

ку осуществляли следующим образом: помещали в коническую колбу (100 см<sup>3</sup>) около 4,5–5,5 г тестируемой композиции (взвешенной с точностью до второго знака после запятой), далее прибавляли 10 см<sup>3</sup> дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре до полной гомогенизации образца (0,25 ч.). К суспензии прибавляли 40 см<sup>3</sup> изопропилового спирта и 0,1 см<sup>3</sup> ледяной уксусной кислоты, после чего продолжали перемешивание в течение 4 часов. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) и хроматографировали.

Аналогично пробоподготовка осуществлялась и для другой препаративной формы – твердых брикетов, за исключением предварительного измельчения образца на бытовой металлической терке и использования в качестве экстрагента 1,4-диоксана вместо изопропанола. Альтернативно проводили экстракцию другими растворителями (табл. 1).

Для установления возможного влияния ультразвуковой обработки на полноту извлечения компонентов, аликвоту пробы экстракта после перемешивания на магнитной мешалке помещали на 0,25 часа в ультразвуковую установку Кристалл-2,5 (ОАО «ОКТБ Кристалл», Россия), а затем отфильтровывали и хроматографировали.



**Рис. 2.** Хроматограммы растворов экстракта (изопропанол:  $H_2O$ :  $CH_3COOH$  = 40: 10: 0,1) из тестовой приманки («мягкие» брикеты) инсекто-родентицидного средства ФИПРАТ АЛТ: 100мг/мл (А) и экстракта (1,4-диоксан:  $H_2O$ :  $CH_3COOH$  = 40: 10: 0,1) из парафинизированной формы («твердые» брикеты) инсекто-родентицидного средства ФИПРАТ АЛТ: 100мг/мл (В). Колонка 4,6×150 мм Reprosil ODS-A, 5 мкм. Система  $CH_3CN$ :  $H_2O$ :  $CH_3COOH$  (70: 30: 1);  $\lambda$  = 280 нм; 0,5 мл/мин.

### Результаты и их обсуждение

Аналитическое определение титульной субстанции фипронил в объектах окружающей среды требует привлечения высокобюджетных аналитических методов: привлекаются газовая хроматография (электронно-захватное [4, 5] и масс-спектрометрическое [5–7] детектирование) и тандемная высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС/МС) [8]. Аналогично определение бромадиолона (и других производных 4-гидроксикумаринового ряда) методами ВЭЖХ с различными вариантами МС-детектирования [9, 10]. Безуслов-

но, с помощью приведенных в данных работах методических подходов можно смоделировать стартовые условия анализа титульной субстанции в инсекто-родентицидных средствах, однако используемое при этом оборудование/режимы недоступны большинству профильных лабораторий. При этом даже следование этим продвинутым методикам, как и более простым решениям ВЭЖХ с различными вариантами детектирования [11–14], только в ряде случаев приводит к разрешению некоторых геометрических изомеров производных 4-гидроксикумаринового ряда с использованием градиентного элюирования, а также ультрафиолетового [15] и флуориметрического [16, 17] детектирования.

Добиться разрешения геометрических изомеров для трех родентицидов титульного ряда (дифенакум, бродифакум и флюкумафен) одновременно, используя изократический режим и обычный стартовый ультрафиолетовый детектор, удалось относительно недавно [18–20]. В данной работе удалось расширить этот список за счет субстанции бромадиолон, проводя разделение изомеров (УФ-детектирование) в простейших и легко воспроизводимых условиях без использования ионпарного варианта ВЭЖХ с УФ- [15], флуориметрического [17] или МС- [10] детектирования.

Схожая картина наблюдается и при анализе изомерного состава фипронила в инсектицидных гелях [21]. Продвинутые хроматографические методики (многомерная хроматография или использование хиральных стационарных фаз) вряд ли оправданы при рутинном контроле продукции, однако даже в ОФ-режиме удалось добиться дублирования сигналов на хроматограммах как для экстрактов, так и для стандартного раствора [21], не фиксирующегося, например, при разделении на более длинной колонке (250 мм), с большим зернением сорбента 10 мкм [22] при использовании схожего типа привитой фазы. Однако связывать этот эффект с определением оптических изомеров и тем более пытаться интерпретировать эти изомеры крайне рискованно.

Остается не очень понятной природа проявления сигналов для двух форм бромадиолона на хроматограммах (рис. 1, 2). Ранее подобная оценка полученного разделения не проводилась. Данное производное не подвержено напрямую кольчато-цепной таутомерии в растворе в отличие от других представителей производных 4-гидроксикумарина (зоокумарина, синкумара, фе-промарона) [23, 24], что исключает, казалось бы, образование гемикетального жесткого остова с различной ориентацией объемного 4-бромобифенильного заместителя. В то же время малове-

Таблица 1

**Результаты исследования промышленных образцов  
инсекто-родентицидного средства «ФИПРАТ АЛТ»**

№п/п	Субстанция	Содержание в исх. средстве (нормативное значение), % масс.	Экстрагент	Обнаружено, % масс.
1	ФИПРАТ АЛТ мягкий брикет (тестовая приманка)			
	Фипронил	0,0020±0,0005	Изопропанол: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (40: 10: 0.1)	0,0019±0,0002
	Бромадиолон	0,005±0,001		0,0049±0,0004
2	ФИПРАТ АЛТ мягкий брикет (тестовая приманка)			
	Фипронил	0,0020±0,0005	Ацетонитрил: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (40: 10: 0,1)	0,0018±0,0002
	Бромадиолон	0,005±0,001		0,0042±0,0004
3	ФИПРАТ АЛТ твердый брикет (парафинизированная приманка)			
	Фипронил	0,0020±0,0005	Ацетонитрил: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (40: 10: 0.1)	0,0010±0,0002
	Бромадиолон	0,005±0,001		0,0012±0,0004
4	ФИПРАТ АЛТ твердый брикет (парафинизированная приманка)			
	Фипронил	0,0020±0,0005	Изопропанол: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (40: 10: 0.1)	0,0011±0,0002
	Бромадиолон	0,005±0,001		0,0018±0,0004
5	ФИПРАТ АЛТ твердый брикет (парафинизированная приманка)			
	Фипронил	0,0020±0,0005	1,4-Диоксан: H <sub>2</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (40: 10: 0.1)	0,0018±0,0002 0,0018±0,0002*
	Бромадиолон	0,005±0,001		0,0043±0,0004 0,0045±0,0004*

\* результат после дополнительной обработки ультразвуком

роятно, что удалось достичь практически полного разделения групп оптических изомеров.

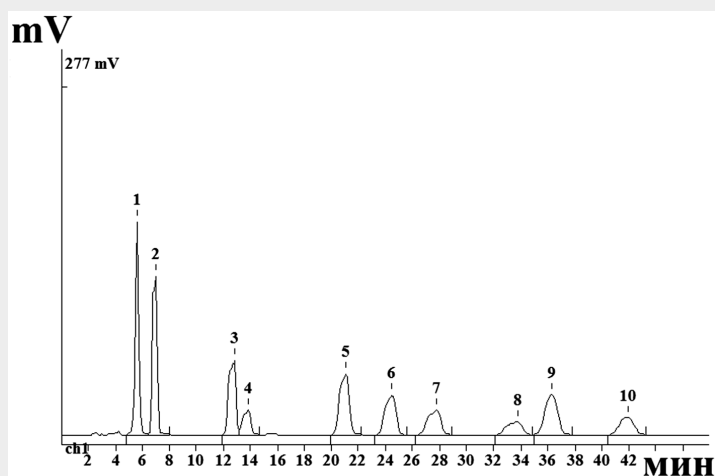
В любом случае нельзя исключать образование псевдогемикетала за счет внутримолекулярной водородной связи, при котором будет фиксироваться *цис*- и *транс*-ориентация фенильного и 4-бромобифенильного заместителей относительно условно жесткого псевдогемикетального остова.

Нами был установлен режим идентификации фипронила и бромадиолона в модельном растворе (рис. 1). В процессе выбора режима хроматографирования пришлось отказаться от ранее выработанной схемы с применением хроматографической колонки на основе Сепарон SGX C18 Супер (RP-S), поскольку при ее использовании не удавалось обеспечить разделение фипронила с наиболее полярными производными 4-гидроксикумаринов (куматетралил и зоокумарин), несмотря на то, что данный тип стационарной фазы хорошо себя зарекомендовал при анализе производных 4-гидроксикумаринового ряда [18–20]. Это не означает, что использование данного типа неподвижной фазы неприменимо для анализа исследованных препаративных форм на основе фипронила и бромадиоло-

на, просто в этом случае нельзя будет сделать заключение о соотношении изомерных форм инсектицидной и родентицидной субстанций относительно стандартов (или эталонных образцов), т. е. по сути исключается теоретическая возможность провести оценку подлинности продукции и, соответственно, оценку поставщика исходных субстанций при входном контроле сырья.

Проведение подобной оценки сопряжено с рядом ограничений по концентрации, что может повлечь за собой дополнительные действия при анализе готовой продукции (концентрирование пробы). Ранее было показано, что оценку изомерного состава фипронила необходимо проводить в диапазоне от 0,005 до 0,15 мг/мл [21], что более чем в 2 раза превышает содержание его в экстрактах (около 0,002 мг/мл), полученных по описанной выше схеме (минимально детектируемая концентрация фипронила 0,0005 мг/мл [21]). Таким образом, необходимо концентрирование пробы перед проведением оценки изомерного состава.

Оценка изомерного состава бромадиолона в протестированной продукции, напротив, не требует дополнительного концентрирования пробы, однако необходимо заметить, что не во всех слу-



**Рис. 3.** Хроматограмма модельного раствора смеси родентицидов: зоокумарин (пик 1) 0,0029 мг/мл; куматетралил (пик 2) – 0,0030 мг/мл; бромадиолон (пики 3, 4) – 0,0030 мг/мл; дифенакум (пики 5, 6) – 0,0039 мг/мл; флюкумафен (пики 7, 8) – 0,0039 мг/мл и бродифакум (пики 9, 10) – 0,0027 мг/мл. Колонка 4.6×150 мм Reprosil ODS-A, 5 мкм. Система CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O: CH<sub>3</sub>COOH (70: 30: 1); λ = 280 нм; 0,5 мл/мин.

чаях эта процедура может быть проведена, поскольку аналитические сигналы экстрагируемых из «тяжелых» пищевых матриц компонентов могут накладываться на сигнал минорной изомерной формы бромадиолона (рис. 2 А, В). Это же в некоторой степени может касаться и всех других возможных препаративных форм родентицидных субстанций гипотетических инсекто-родентицидных препаратов на основе производных 4-гидроксикумарина. Хроматограмма модельного раствора шести основных родентицидов данной группы в условиях анализа приведена на рис. 3.

Из приведенной на рис. 3 хроматограммы видно, что даже концентрация в 0,003 мг/мл (вплоть до 0,0005 мг/мл) не является пороговой для определения изомерного состава бромадиолон в растворах/экстрактах.

Отдельно стоит остановиться на подборе экстракционных условий. Полученные нами данные (табл. 1) подтверждают неполное извлечение фипронила/бромадиолон для твердых брикетов на основе парафинизированной пищевой приманки при использовании некоторых экстракционных систем (подкисленные элюирующая смесь и система на основе смеси изопропанола и воды).

В целом, эти сведения повторяют полученные ранее данные для парафинизированных форм

родентицидных препаратов [18, 19], однако при проведении экстракции системой на основе 1,4-диоксана из тех же исследуемых образцов были определены действующие вещества в количествах, соответствующих нормативным требованиям к исследуемым средствам (табл. 1), при этом максимальное извлечение было достигнуто при дополнительной обработке пробы ультразвуком (0,25 часа). По-видимому, столь низкое извлечение было вызвано тем, что парафинизированная форма препятствует извлечению действующих веществ за счет низкой растворимости компонентов матрицы в ацетонитриле и изопропанол по сравнению с 1,4-диоксаном.

Нестандартно выглядят данные экстракционного извлечения и определения действующих веществ (фипронил 0,025%, бромадиолон 0,0025% и флюкумафен 0,0025%) в инсекто-родентицидном средстве ЗД-ХИТ (ООО «ВТВ-сервис», Россия). С одной стороны, в разработанной методике авторам удалось разделить бромадиолон в градиентном режиме хроматографирования с использованием фазы с привитыми NH<sub>2</sub>-группами (Лихросорб NH<sub>2</sub>), однако разделения фипронила или другого родентицида (производного 4-гидроксикумарина – флюкумафена), не было зафиксировано [25]. Вместе с тем, в качестве экстрагента для брикетированной формы был рекомендован подкисленный уксусной кислотой (1%) ацетонитрил [25], хотя ранее [18], при использовании подкисленных моносольвентов удавалось осуществить извлечение только для относительно простых непещевых матриц. В случае использования предлагаемого нами варианта хроматографического анализа в изократическом режиме становится возможным определить изомерные формы всех действующих веществ данной композиции. Однако, безусловно, оценивать степень и полноту извлечения экстракционными системами необходимо каждый раз при внедрении методики анализа непосредственно в лаборатории.

Отдельно стоит остановиться на возможности использования предложенного аналитического подхода для скрининговой оценки продукции, поскольку нередки случаи, когда производители в целях уменьшения себестоимости стремятся всячески снизить содержание более дорогих субстанций за счет увеличения более дешевых. Также понятно и желание производителя найти поставщика субстанции (титульные соединения не производятся на территории РФ и Таможенного союза [26]), предлагающего наименьшую стоимость при высоких показателях по процентному содержанию. Например, только на одном сайте

(не являющемся торговой интернет-площадкой) содержатся данные о более чем двадцати китайских поставщиках субстанции бромдиолон [27]. Что это за сырье, какие данные относительно изомерного состава может предоставить заказчик, каковы данные относительно биологической эффективности образцов субстанций с разным изомерным составом – вызывает законный интерес производителей инсекто-родентицидных средств. Между тем, ранее приводившиеся данные [19, 20] о различной токсичности родентицидов для крыс указывает на несколько большую роль цис-изомерных форм как минимум для таких производных как дифенакум и бродифакум (цисдифенакум – пик 6, цисбродифакум – пик 10 на хроматограмме см. рис. 3).

В некоторой степени это же относится и к субстанции фипронил. Поскольку данная субстанция является смесью оптических изомеров (S- и R-формы), следовало бы ожидать значительной разницы в биологической эффективности изомерных форм по аналогии с другими синтетическими инсектицидами [28, 29]. Однако эта разница не оказывается решающей: оптическая S-форма субстанции фипронил отличается по активности не более чем в полтора раза, причем наблюдается как разнонаправленная динамика по скорости действия, так и разброс по эффективности в зависимости от видовой принадлежности насекомых [30, 31]. Таким образом, соотношение между изомерами фипронила не будет столь важно, как в случае с родентицидными субстанциями, однако данную информацию все же можно использовать в оценке поставщиков.

### Заключение

Экспериментально осуществлен анализ инсекто-родентицидных композиций на основе пищевых матриц и парафина, содержащих инсектицидную субстанцию фипронил и родентицид – бромдиолон. Были рассмотрены различные варианты экстракционного извлечения целевых компонентов из матриц. Последующее хроматографическое определение осуществленное на базовом оборудовании (изократическое элюирование и УФ-детектирование при 280 нм) с использованием неподвижной фазы дает возможность осуществлять скрининговые исследования фипронила в присутствии шести различных гомологов родентицидов подгруппы 4-гидроксикумарина, включая оценку изомерного состава для большинства субстанций. Результаты подобного скрининга могут быть использованы для процедур, связанных с оценкой поставщиков и установлением факта фаль-

сификации продукции при возможной замене сырья на более экономически выгодное (по показателям процентного содержания, стоимости или наличия более активных изомерных форм субстанций).

### Список использованной литературы References

- 1. Костина М. Н., Рябов С. В., Алешо Н. А.** Преграда – клеевая ловушка. Экологически безопасное инсекто-родентицидное средство // Пест-Менеджмент. 2013. №3. С. 18–23. [Kostina M. N., Ryabov S. V., Alesho N. A. Barrier – glue trap – an environmentally safe insecto-rodenticide // Pest management (ISSN 2076-8462). 2013 (3): 18–23.] [In Russian].
- 2. Еремина О. Ю., Лопатина Ю. В., Рябов С. В., Лиманцев А. В.** 3Д-ХИТ – новое инсекто-родентицидное средство // Пест-Менеджмент. 2014. №1. С. 31–35. [Eremina O. Yu., Lopatina Yu. V., Ryabov S. V., Limancev A. V. 3D-HIT – the new insecto-rodenticide bait // Pest management (ISSN 2076-8462). 2014 (1): 31–35.] [In Russian].
- 3. Реестр свидетельств о государственной регистрации** (единая форма Таможенного союза, российская часть) [Электронный ресурс] Режим доступа <http://fp.crc.ru/evrazes> (дата обращения 27.10.2017).
- 4. Kurz M. H. S., Martel S., Gonçalves F. F., et al.** Development of a fast method for the determination of the insecticide fipronil and its metabolites in environmental waters by SPE and GC-ECD // J. Braz. Chem. Soc. 2013. V. 24. №4. P. 631–638.
- 5. Sánchez-Brunete C., Miguel E., Albero B., Tadeo J. L.** Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography // Span J. Agric. Res. 2008. V. 6. P. 7–14.
- 6. Kaur R., Mandal K., Kumar R., et al.** Analytical method for determination of fipronil and its metabolites in vegetables using the QuEChERS method and gas chromatography/mass spectrometry // Journal of AOAC International. 2015. V. 98. №2. P. 464–471.
- 7. Vilchez J. L., Prieto A., Araujo L., Navalon A.** Determination of fipronil by solidphase microextraction and gas chromatography – mass spectrometry // J. Chromatogr. 2001. V. 919A. P. 215–221.
- 8. Li M., Li P., Wang L., et al.** Determination and dissipation of fipronil and its metabolites in peanut and soil // Anal. Chem. 2017. doi: 10.1021/jf5054589.
- 9. Cai X.-X., Zhang X.-Y.** Simultaneous determination of eleven rodenticides in human plasma and urine using ultra performance liquid

chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry // *Chin. J. Analyt. Chem.* 2010. V. 38. №10. P. 1411–1416.

**10. Marek L. E. J., Koskinen W. C.** Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry // *J. Agric. Food Chem.* 2007. V. 55. №3. P. 571–576.

**11. Mundy D. E., Machin A. F.** Determination of the rodenticide difenacoum in biological materials by high-pressure liquid chromatography with confirmation of identify by mass spectrometry // *J. Chromatogr.* 1977. V. 139. №2. P. 321–329.

**12. Breckenridge A. M., Cholerton S., Hart J. A. D., et al.** A study of the relationship between the pharmacokinetics and the pharmacodynamics of the 4-hydroxycoumarin anticoagulants warfarin, difenacoum and brodifacoum in the rabbit // *Br. J. Pharmac.* 1985. V. 84. P. 81–91.

**13. Jones A.** HPLC determination of anticoagulant rodenticide residues in animal livers // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1996. V. 56. P. 8–15.

**14. Fauconnet V., Pouliquen H., Pinault L.** Reversedphase HPLC determination of eight anticoagulant rodenticides in animal liver // *J. Analyt. Toxicol.* 1997. V. 21. P. 548–553.

**15. Hunter K.** High-performance liquid chromatographic strategies for the determination and confirmation of anticoagulant rodenticide in animal tissues // *J. Chromatogr.* 1985. V. 321. P. 255–272.

**16. Kelly M. J., Chambers J., MacNicoll A. D.** Simple and rapid method for the determination of the diastereomers of difenacoum in blood and liver using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection // *J. Chromatogr.* 1993. V. 620. №1. P. 105–112.

**17. Kuijpers E. A. P., Hartigh J., Savelkoul T. J. F., de Wolf F. A.** A method for the simultaneous identification and quantitation of five superwarfarine rodenticides in human serum // *J. of Anal. Toxicol.* 1995. V. 19. P. 557–562.

**18. Кочетов А. Н., Шестаков К. А., Шпилевский Г. М., Кузьмина Л. Г.** Особенности определения содержания замещенных в третьем положении 4-гидроксикумаринов в дезинфекционных средствах и фармпрепаратах // *Хим.-фарм. журнал.* 2013. Т. 47. №2. С. 41–50. [Kochetov A. N., Shestakov K. A., Shpilevskii G. M., Kuz'Mina L. G. Peculiarities of determining the content of 3-substituted 4-hydroxycoumarins in disinfectants and drugs // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2013 47(2): 109 – 117.].

**19. Носикова Л. А., Кочетов А. Н.** Анализ дифенакума в родентицидных компози-

циях, содержащих производные куматетралила // *Тонкие хим. технологии.* 2015. Т. 10. №6. С. 88–95. [Novikova L. A., Kochetov A. N. Analysis of difenacoum in rodenticide compositions containing derivatives coumatetralyl // *Fine chemical technology* (ISSN 2410-6593). 2015 10(6): 88–95] [In Russian].

**20. Носикова Л. А., Кочетов А. Н.** Оценка поставщиков родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда с использованием метода ОФ ВЭЖХ // *Пест-Менеджмент.* 2015. №4. С. 42–52. [Novikova L. A., Kochetov A. N. Evaluation of suppliers of rodenticides substances 4-hydroxycoumarin using the method of RP HPLC // *Pest management* (ISSN 2076-8462). 2015 (4): 42–52.] [In Russian].

**21. Носикова Л. А., Кочетов А. Н.** Анализ инсектицидных гелей, содержащих фипронил, методом ОФ ВЭЖХ // *Тонкие хим. технологии.* 2018. Т. 13. №2. С. 72–80. [Novikova L. A., Kochetov A. N. Analysis of insecticide gels containing fipronil by RP HPLC // *Fine chemical technology* (ISSN 2410-6593). 2018 13(2): 72–80] [In Russian].

**22. Hadjmohammadi M. R., Nikou S. M., Kamel K.** Determination of fipronil residue in soil and water in the rice fields in north of Iran by RP-HPLC method // *Acta Chim. Slov.* 2006. V. 53. P. 517–520.

**23. Кочетов А. Н., Кузьмина Л. Г.** Строение и таутомерные превращения замещенных в третьем положении 4-гидроксикумаринов (обзор) // *Химико-фармацевтический журнал.* 2010. Т. 44. №2. С. 19–24. [Kochetov A. N., Kuz'Mina L. G. Drug synthesis methods and manufacturing technology: Structure and tautomeric transformations of 3-substituted 4-hydroxycoumarins (review) // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2010 44(2): 68–73.].

**24. Кочетов А. Н., Кузьмина Л. Г.** Кристаллическая структура молекулярного комплекса 3-[1-(4-нитрофенил)-3-оксобутил]-4-гидроксихромен-2-она с этиловым спиртом // *Кристаллография.* 2007. Т. 52. №4. С. 694–696. [Kochetov A. N., Kuz'Mina L. G. Crystal Structure of the Molecular Complex of 3-[1-(4-Nitrophenyl)-3-oxobutyl]-4-hydroxychromen-2-one with ethanol // *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2007 52(4): 668–671.].

**25. Инструкция по применению инсекто-родентицидного средства ЗД-ХИТ** [Электронный ресурс] Режим доступа [http://www.vtv-service.ru/published/DD/2.0/wg\\_link.php?fp=a1eee394&DB\\_KEY=ROJWVFZTRVJWSVM+](http://www.vtv-service.ru/published/DD/2.0/wg_link.php?fp=a1eee394&DB_KEY=ROJWVFZTRVJWSVM+) (дата обращения 27.10.2017).

**26. Махнева Т. В., Чепко В. И., Захарченко А. В., Чижов А. И., Дубинский Д. Ю., Рябов В. В., Коломников Г. И., Кудрявцева Е. Е., Ильин И. Ю., Тополянский Б. Е., Новиков В. С., Помогаева Л. С., Куршин Д. А., Сусло М. А., Чуев И. П.** Вклад отечественных производителей средств дезинфекции, дезинсекции и дератизации в развитие дезинфекционного дела в Российской Федерации // Дезинфекционное дело. 2006. №3. С. 17–22. [Makhneva T. V., Chepko V. I., Zakharchenko A. V., Chijov A. I., Dubinski D. Yu., Ryabov V. V., Kolomnikov G. I., Kudriavtseva E. E., Iljin I. Yu., Topolyanski B. E., Novikov V. S., Pomogaeva L. S., Kurshin D. A., Suslo M. A., Chuev I. P. Deposit of producers means of disinfection, disinsection and deratization in development of disinfection means of Russian Federation // Disinfection affairs (ISSN 2076-457X). 2006 (3): 17–22] [In Russian].

**27. Реестр поставщиков субстанции бромадиолон** [Электронный ресурс] Режим доступа [http://www.chemicalbook.com/ProductList\\_En.aspx?kwd=28772-56-7](http://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=28772-56-7) (дата обращения 09.06.2017).

**28. Носикова Л. А., Кочетов А. Н.** Возможности установления изомерного состава действующих веществ в инсектицидных композициях // Дезинфекционное дело. 2016. №1. С. 44–56. [Nosikova L. A., Kochetov A. N. The possibility of establishing isomeric composition of active substances in insecticide compositions // Disinfection affairs (ISSN 2076-457X). 2016 (1): 44–56] [In Russian].

**29. Носикова Л. А., Кочетов А. Н.** Установление изомерного состава инсектицидной субстанции циперметрин методом обращенно-фазовой ВЭЖХ // Тонкие химические технологии. 2017. Т. 12. №1. С. 76–82. [Nosikova L. A., Kochetov A. N. The establishment of the isomeric composition of the substance cypermethrin insecticide by the method of reversed-phase HPLC // Fine chemical technology (ISSN 2410-6593). 2017 12(1): 76–82] [In Russian].

**30. Teicher H. B., Kofoed-Hansen B., Jacobsen N.** Insecticidal activity of the enantiomers of fipronil // Pest Managm. Sci. 2003. V. 59. P. 1273–1275.

**31. Хьюбер С. К.** Композиция энантиомеров-5-амино-3-циано-1-(2,6-дихлор-4-трифторметилфенил)-4-трифторметилсульфинилпиразола: Пат. 2241331, РФ // Б.И. 2004. № 34. С. 20. . [Huber S.K. Composition of enantiomers of 5-amino-3 cyano-1 (2,6-dichlor-4-trifluoromethylphenyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole: Pat. 2241331, Russia // B. I. 2004. No. 34. P.20.] [In Russian].

### Optimization of the determination of active substances in insectorodenticide means on the basis of fipronil derivatives with 4-hydroxycoumarin by the method of RP HPLC

*Nosikova L. A., Kochetov A. N.*

**Nosikova L. A.**, Ph. D. (Chemistry), associate professor MIREA – Russian Technological University (M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia); senior researcher A. N. Frumkin Institute of Physical Chemistry and Electrochemistry of the Russian Academy of Sciences (IPCE RAS), (31, Leninsky Pr, Moscow, 119991, Russia); E-mail: nosikova\_lyubov@mail.ru., ResearcherID 679715.

**Kochetov A. N.**, Ph. D. (Chemistry), Senior Lecturer MIREA – Russian Technological University (M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), (86, Vernadskogo Pr., Moscow, 119571, Russia), E-mail: kochchem@mail.ru., ResearcherID: 213376.

Summary. Examples of joint determination of fipronil (an insecticide phenylpyrazole number) and the product appears (anticoagulant rodenticide 4-hydroxycoumarin series) by the method of RP HPLC are considered. Optimization of the extraction conditions of various preparative forms on the basis of these active substances, including hard and soft briquettes containing food components and paraffin as matrices, has been carried out. The possibility and expediency of estimating the isomeric composition of title derivatives are discussed. The found conditions of chromatographic determination in the isocratic regime open wide opportunities both for harmonization of methods of analysis of other insecticidal agents on the basis of homologues of 4-hydroxycoumarin series and for implementation of the procedure of evaluation of suppliers or establishment of the fact of product falsification.

Keywords: insecto voderenticide, fipronil, warfarin, couma tetralyl, bromadiolone, difenacoum, flocoumafен, brodifacoum, RP HPLC, evaluation of suppliers, counterfeit, cis-, trans-, «isomers».