

Определение изомерного состава дифетиалона в родентицидной продукции методом ОФ ВЭЖХ. От оценки поставщиков к мониторингу препаративных форм

Носикова Л. А.^{1,2}, доцент кафедры химии и технологии редких и рассеянных элементов и наноразмерных композиционных материалов;

Кочетов А. Н.¹, канд. хим. наук, старший преподаватель кафедры неорганической химии

¹ МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий имени М. В. Ломоносова), Россия 119571, Москва, пр. Вернадского, 86.

² 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 определения дифетиалона в технической субстанции, родентицидном концентрате и готовых родентицидных формах методом ОФ ВЭЖХ. Осуществлено интегрирование аналитического определения дифетиалона в групповой метод определения гомологов 4-гидроксикумаринового ряда. Выбранные условия хроматографирования в изократическом режиме элюирования позволяют осуществлять оценку изомерного состава самой липофильной субстанции (дифетиалона) среди рассмотренных в исследовании. Условия экстракционного извлечения из различных препаративных форм полностью совпадают с ранее предложенными для оценки производных 4-гидроксикумаринового ряда и включают зерновую приманку, твердые и мягкие брикеты, содержащие в качестве матриц пищевые компоненты и парафин. Найденные условия определения изомерного состава дифетиалона открывают широкие возможности как для гармонизации методов анализа родентицидных/инсекто-родентицидных средств на основе гомологов 4-гидроксикумаринового/тиокумаринового рядов, так и для оценки поставщиков или установления факта фальсификации продукции в случае замены дифетиалона на более дешевые субстанции.

Ключевые слова: дифетиалон, антикоагулянтные родентициды, зоокумарин, куматетралил, бромадиолон, дифенакум, флокумафен, бродифакум, ОФ ВЭЖХ, оценка поставщиков, фальсификат, изомерные формы, цис-, транс-, pest control, определение.

Введение

Дифетиалон является самой «молодой» субстанцией антикоагулянтного механизма действия из использующихся в настоящее время. Появившись в конце 80-х годов прошлого века, он достаточно долгое время остается в тени своих более дешевых предшественников – антикоагулянтных родентицидов 4-гидроксикумаринового ряда [1]. Проблемы при синтезе дифетиалона сходны с проблемами, возникающими при синтезе его ближайшего аналога – бродифакума, и заключаются в получении 3-(4'-бромбифенил-4'-ил)-1,2,3,4-тетрагидронафтален-1-ола [2–4], что в значительной мере влияет на конечную стоимость субстанции. Существенно, что сам дифетиалон является производным 4-гидроксикумарины, т. е. отличается от своего 4-гидроксикумаринового аналога бродифакума только наличием в кумариновом фрагменте вместо атома кислорода – атома серы. Другим таким тиоаналогом является «тиофлокумафен» (аналог флокумафена), ранее охарактеризованный [5].

Замена гетероатома кислорода на атом серы в ароматическом остове молекул родентицидов второй генерации 4-гидроксикумаринового ряда является, повидимому, самым очевидным путем синтеза антикоагулянтных родентицидов третьего поколения [6], поскольку традиционно тиопроизводные являются менее полярными, а потому более липофильными относительно оксопроизводных, что полностью соответствует одному из критериев, предъявляемых к антикоагулянтам третьей генерации [7]. Подобная оценка липофильности применяется и при молекулярном докинге производных, обладающих схожим механизмом биологического воздействия [8, 9]. В настоящее время дифетиалон является не только самым токсичным для грызунов [1] антикоагулянтным родентицидом из коммерчески доступных субстанций, но и самым дорогостоящим производным. Повышенная токсичность для теплокровных животных дает возможность одновременно снижать концентрацию действующих веществ в приманках и усиливать контроль за производством продук-

ции на всех технологических стадиях, исключая плохое гомогенизирование препаративных форм.

Использование в готовых приманках дифетиалона (как в некоторой степени модифицированной молекулы бродифакума) может, скорее всего, на некоторое время лишь отдалить возможный кризис на рынке субстанций для пест-контроля по мере появления резистентности к данному производному на территории Таможенного союза. «Отголоски» резистентности к антикоагулянтным родентицидам 4-гидроксикумаринового ряда докатились, повидимому, и до нашей страны [6, 10]. Тем не менее использование данной субстанции, несмотря на ее высокую стоимость, в смесевых композициях с более коммерчески доступными субстанциями 4-гидроксикумаринового ряда будет оправдано. Последнее обстоятельство предъявляет дополнительные требования к аналитическим методам определения дифетиалона в коммерческих продуктах.

Целью настоящего исследования явилась выработка методических подходов к созданию гармонизованного метода контроля дифетиалона на фоне возможного применения других родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда, при этом особое значение придавалось возможности идентификации изомерного состава субстанции, что послужило бы отличным ориентиром в оценке сырья/продукции.

Материалы и методы

Для проведения исследований использовали следующие аналитические стандарты: Дифетиалон 98.8% (KUKBO SCIENCE Co., Ltd, Корея), 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). Изопропанол (х. ч., ГОСТ 18300-87), хлороформ (х. ч., ТУ 6-09-06-4263), 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) использовались без предварительной очистки.

Проведение ВЭЖХ в сочетании с УФ-детектированием осуществляли на хроматографе Waters 490 (Waters Ltd., Watford, UK), оснащенный насосом Altex модели 110A, инжектором Rheodyne с объемом петли 20 мкл, УФ-детектором модели 490 с переменной длиной волны. Использовали колонку из нержавеющей стали: (4.6×150 мм), заполненную 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 $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$ составляло 70 : 30 : 1 и 75 : 25 : 1. 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. Путем разбавления 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 были проверены на содержание действующих веществ техническая субстанция, жидкий и дустовый родентицидные концентраты (0.25 %) и готовые средства: «Тайфун-3» (зерновая приманка), «Тайфун-ТБ» (твердые парафинизированные брикеты), «Тайфун-МБ» (мягкие тестобрикеты) (ООО «Алина Нова Проф», Россия).

Пробоподготовку, предшествующую хроматографическому определению действующих веществ (дифетиалон, флокумафен) в приманках на основе прессованного теста и зерна, осуществляли следующим образом: в коническую колбу вместимостью 100 см³ помещали около 4.5–5.5 г зерновой (тестовой) приманки и взвешивали с точностью до второго знака после запятой. К навеске прибавляли 10 см³ воды и перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 0.15 часа. Далее последовательно добавляли 0.2 см³ уксусной кислоты и 40 см³ изопропанола и продолжали перемешивание 1.5 часа, затем образец помещали в ультразвуковую установку (использовали установку «Кристалл-2,5», ОАО «ОКТЬ Кристалл», Россия) и подвергали ультразвуковому воздействию 0.5 часа при комнатной температуре. Продолжали перемешивание образца на магнитной мешалке 1.0 час. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента), и аликвоту фильтрата хроматографировали в изократическом режиме.

Аналогично пробоподготовка осуществлялась 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.

Пробоподготовка жидкого родентицидного концентрата осуществлялась растворением на-

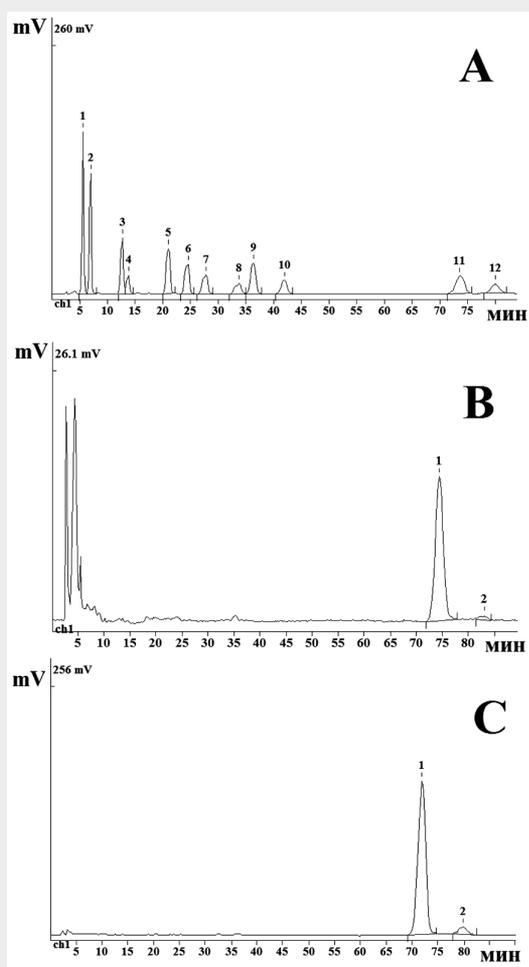


РИС. 2. Хроматограммы модельного раствора смеси родентицидов: зоокумарин (пик 1) 0.029 мг/мл; куматетралил (пик 2) – 0.030 мг/мл; бромадиолон (пики 3, 4) – 0.030 мг/мл; дифенакум (пики 5, 6) – 0.039 мг/мл; флюкумафен (пики 7, 8) – 0.039 мг/мл; бродифакум (пики 9, 10) – 0.027 мг/мл и дифетиалон (пики 11, 12) – 0.024 мг/мл (А), растворов экстракта (изопропанол) из жидкого родентицидного концентрата: 20 мг/мл (В) и технической субстанции в изопропанол: 0.200 мг/мл (С). Подвижная фаза $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$ (70 : 30 : 1)

вески концентрата около 0.8–1.2 г (взвешивание с точностью до 0.001 г) изопропанолом в мерной колбе на 25 см³ при кратковременной (в течение 0.10 часа) ультразвуковой обработке.

Пробоподготовка родентицидного порошкообразного премикса осуществлялась на магнитной мешалке при кратковременной обработке ультразвуком. Для этого к навеске дустрированной формы около 0.8–1.2 г (взвешивание с точностью до 0.001 г) в конической колбе на 50 см³ добавляли 25 мл изопропанола и перемешивали на магнитной мешалке при комнатной темпера-

туре в течение 1 часа, затем образец помещали в ультразвуковую установку и подвергали ультразвуковому воздействию 0.5 часа при комнатной температуре. Продолжали перемешивание образца на магнитной мешалке 1.0 час. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента), и аликвоту фильтрата хроматографировали в изократическом режиме.

Результаты и их обсуждение

Большинство аналитических методик определения дифетиалона базируется на применении ионпарного варианта ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования. Использование ионпарных режимов и градиентного элюирования производится в сочетаниях с флуориметрическим [11–13], ультрафиолетовым [12, 14–16], диодноматричным [13, 17] и масс-спектрометрическим [18–20] типами детекторов. Только использование масс-спектрометрического детектирования в некоторой степени ограничивает исследователей в применении ионпарных режимов хроматографирования, что делает предпочтительным метод ОФ ВЭЖХ, поскольку в этом случае использование буферных растворов, содержащих дополнительные органические/неорганические соли (ионного фона), не будет в полной мере препятствовать испарению пробы непосредственно перед детектированием антикоагулянтных родентицидов [21]. Чаще всего используют сочетание ионпарного варианта ВЭЖХ с применением метода градиентного элюирования. Нам представляется избыточным использование ионпарных условий хроматографического разделения в градиентном режиме производных 4-гидроксикумарина/тиокумарина, поскольку это влечет за собой дополнительную подготовку нескольких растворов элюентов и наличие градиентного насоса, стоимость которого существенно превосходит стоимость обычного изократического насоса. Более того, незначительная погрешность создания градиента насосом при смешении двух и более элюентов влечет за собой значительное изменение времени удерживания аналитов, тогда как использование изократического оборудования приводит к более стабильным результатам. Платой за стабильность показателей и высокую воспроизводимость хроматографических данных в изократическом режиме элюирования служит несколько большее время анализа и, соответственно, увеличивающийся расход моноэлюента.

Избыточны и рекомендации по привлечению дорогостоящих вариантов детекторов – диодноматричного, флуориметрического и масс-спектрометрического для осуществления рутинного анализа продукции, содержащей антикоагулянтные родентициды. Только в случае исследования

биологических жидкостей и тканей такой подход выглядит оправданным, поскольку удается значительно понизить минимальную границу определения субстанций в пробах за счет значительно более чувствительных типов детектирования.

Ранее были продемонстрированы хорошие возможности использования простейшего ультрафиолетового типа детектирования для определения производных 4-гидроксикумаринового ряда в различных препаративных формах [22–25]. Использованное нами ранее универсальное значение длины волны детектирования для производных 4-гидроксикумаринового ряда – 280 нм оказалось в диапазоне, предлагаемом различными исследователями для идентификации дифетилалона: 262 нм [14, 15], 260 нм [16] и 286 нм [26]. Что касается использования градиентного режима элюирования, то его применение не всегда может привести к разделению геометрических изомеров производных 4-гидроксикумаринового/тиокумаринового рядов в случае исследования мультикомпонентных растворов, даже при использовании самых чувствительных типов детектирования. Так при анализе мультикомпонентных смесей [11–14, 18–21] производных данной группы наблюдается разделение геометрических изомеров только для бромадиолона [13, 18, 19, 21], дифенакума [19, 21], флокумафена [18, 19], бродифакума [19, 21] и дифетилалона [19]. При этом недавно [19] только при использовании поверхностно-пористого (core-shell) хроматографического сорбента удалось разделить геометрические изомеры сразу для пяти производных. Внедрение передовых технологий поверхностно-пористых сорбентов с привитыми хиральными фазами позволяет в настоящее время рассматривать возможность определения не только геометрических (*цис*-, *транс*-), но и оптических производных антикоагулянтных родентицидов, как было показано на примере всех четырех оптических изомеров бродифакума [27]. Необходимо отметить, что в наиболее удачных случаях разделения геометрических [19] и оптических [27] изомеров рассматриваемых производных используется масс-спектрометрическое детектирование, применение которого чувствительно к настройкам прибора и калибровке его по массам. Последнее обстоятельство, в случае придания методики статуса международной (EPA, WQA), потребует наличия хотя бы одного дорогостоящего внешнего стандарта (свидетеля, отличающегося от анализа по изотопному составу) [28–30]. Однако данное требование соблюдено только в одной работе, где в случае группового определения производных 4-гидроксикумаринового/тиокумаринового рядов при масс-спектрометрическом детектировании использовали варфарин- d_5 [18].

Использованные нами условия осуществления хроматографического разделения серии производных 4-гидроксикумаринового/тиокумаринового рядов позволяют предложить гармонизованный метод без использования градиентного режима элюирования, ионпарного варианта ВЭЖХ, дорогостоящих типов детекторов и дейтерированных стандартов для их калибровки, пригодный для анализа продукции родентицидного профиля. На рис. 2А видно, что геометрические изомерные формы для бромадиолона, дифенакума, флокумафена, бродифакума и дифетилалона уверенно детектируются, на основании чего можно предложить выбранные нами условия аналитического группового разделения гомологов в качестве бюджетной альтернативы осуществлению хроматографического анализа в градиентном режиме (ионпарный вариант ВЭЖХ) с использованием поверхностно-пористого сорбента и МС/МС детектирование с тройным квадруполом [19]. Разница в стоимости использованного в работе [19] и задействованного нами оборудования как минимум на порядок ниже, при этом эффективность разделения семи производных и геометрических изомеров пяти из них остается на сопоставимом уровне.

Оптимизация метода анализа геометрических изомеров индивидуальной родентицидной субстанции сопряжена с решением меньшего числа проблем, чем при групповом определении. Такие одномерные задачи ранее были решены для бромадиолона [31], дифенакума [32], и дифетилалона [16]. Вместе с тем, сведения об изомерном составе очень ценны, поскольку позволяют не только проследить источник сырья, но и осуществить выбор субстанции с максимальным содержанием более активной изомерной формы [23, 24]. Возможность определить состав оптических изомеров для зоокумарина (4 изомера) и куматетралила (2 изомера) [33] также имеется, например при помощи хиральных стационарных фаз [27, 34], однако практическая значимость такого анализа сомнительна, поскольку стоимость самих субстанций, как и актуальность их применения в практике «pest control» (вследствие возможной резистентности), девальвирует конечный аналитический результат подобного определения.

Использование выверенной тактики осуществления пробоподготовки для антикоагулянтных субстанций, ранее опробованной нами на различных объектах [22–25], позволяет рекомендовать гармонизованный подход, обеспечивающий стабильный результат анализа и укладываемый в нормадопуск (табл. 1) для следующих объектов: «Тайфун-3» (зерновая приманка), «Тайфун-ТБ» (твердые парафинизированные брикеты), «Тайфун-МБ» (мягкие тесто-брикеты).

Таблица 1

Результаты исследования технологических премиксов и промышленных образцов
родентицидных средств, содержащих дифетиалон

№ п/п	Субстанция	Содержание в исх. средстве (нормативное значение), % масс.	Экстрагент	Обнаружено, % масс.
«Тайфун-3» (зерновая приманка)				
1	Флокумафен	0.0015±0.0005	Изопропанол : H ₂ O : CH ₃ COOH (40 : 10 : 0.1)	0.0014±0.0004
	Дифетиалон	0.0020±0.0005		0.0021±0.0004
«Тайфун-МБ» мягкий брикет (тестовая приманка)				
2	Флокумафен	0.0015±0.0005	Изопропанол : H ₂ O : CH ₃ COOH (40 : 10 : 0.1)	0.0015±0.0004
	Дифетиалон	0.0020±0.0005		0.0018±0.0004
«Тайфун-ТБ» твердый брикет (парафинизированная приманка)				
3	Флокумафен	0.0015±0.0005	1,4-Диоксан : H ₂ O : CH ₃ COOH (40 : 10 : 0.1)	0.0017±0.0002
	Дифетиалон	0.0020±0.0005		0.0019±0.0004
«0.25%» жидкий концентрат (технологический премикс)				
4	Дифетиалон	0.25±0.04	Изопропанол	0.25±0.01
«0.25%» дутовый концентрат (технологический премикс)				
5	Дифетиалон	0.25±0.04	Изопропанол	0.26±0.01

При осуществлении анализа дифетиалона разных поставщиков выявилось различное содержание геометрических изомерных форм субстанции. В случае минимального содержания *цис*- формы (оцененной в 5%) концентрация в 0.005 мг/мл оказывается критической для определения изомерного состава (рис. 1А), тогда как содержание *цис*- формы в аналитическом стандарте (рис. 2А) составляет чуть менее 32%. Таким образом, изомерный состав дифетиалона в готовых препаративных формах/премиксах корректнее осуществлять не по аналитическому стандарту с более высоким содержанием *цис*- формы, а непосредственно по технической субстанции, из которой осуществляется приготовление технологических концентратов. Использованное нами соотношение растворителей в составе подвижной фазы CH₃CN : H₂O : CH₃COOH равное 75 : 25 : 1 позволило несколько сократить время осуществления хроматографического разделения без ухудшения разрешения изомерных форм дифетиалона и флокумафена (рис 1А, В) по сравнению с гармонизованным методом контроля дифетиалона в присутствии других родентицидных субстанций 4-гидроксикумаринового ряда, для которых состав подвижной фазы остался неизменным (CH₃CN : H₂O : CH₃COOH равное 70 : 30 : 1) [25]. Помимо дифетиалона и флокумафена на хроматограммах исследованных готовых препаративных форм обнаруживаются следы гомологов (бромадиолона и бродифакума, например пики 1, 4 и 5 рис. 1В), что может говорить о возможном загрязнении технологического оборудования остатками продукции, при изготовлении ко-

торых используются другие родентицидные субстанции. В каждом конкретном случае это «загрязнение» может быть оценено и в дальнейшем использоваться для точной идентификации конкретной партии произведенной продукции.

Вместе с тем исследование родентицидных концентратов-премиксов (содержащих 0.25% дифетиалона), напротив, продемонстрировало отсутствие какого бы то ни было дополнительного родентицидного компонента (рис. 1С, 2В), несмотря на то обстоятельство, что концентрации дифетиалона были существенно (более чем в 100 раз) выше, чем в готовых приманках.

Использованный подход к групповому анализу родентицидов можно рекомендовать для осуществления входного контроля субстанций в рамках оценки поставщиков продукции/услуг в системе менеджмента качества предприятия [24] для большинства родентицидных субстанций, не производящихся на территории нашей страны [35]. В случае скрининговых исследований продукции сразу будет очевиден факт возможной подмены субстанции/ий незадекларированными, как в случае намеренной фальсификации продукции, так и при возникновении случайной ошибки поставщиком субстанции или непосредственно на производстве.

Заключение

Экспериментально осуществлен анализ субстанции и готовых родентицидных композиций и концентратов, содержащих дифетиалон. Во всех случаях определен состав геометрических изомеров (*транс*-/*цис*-) исходной субстанции. Анализ дифетиалона может быть проведен на фоне

возможного использования еще шести антикоагулянтных родентицидов 4-гидроксикумаринового ряда. Определение дифетиалона возможно в гармонизованных условиях проведения хроматографического разделения и осуществления пробоподготовки с производными 4-гидроксикумарина. При этом осуществление хроматографического разделения возможно на обычном оборудовании (изократическое элюирование и УФ-детектирование при 280 нм) с использованием подвижной фазы $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$ равной 70 : 30 : 1. Полученные условия пригодны для осуществления скрининга широкого круга продукции (субстанции, технологические премиксы, препаративные формы) для одновременно содержащихся в пробах семи производных 4-гидроксикумаринового/тиокумаринового рядов. Результаты подобного скрининга, включая данные по содержанию геометрических изомеров для пяти из семи субстанций, могут быть использованы для процедуры оценки поставщиков и установления факта фальсификации продукции.

Список использованной литературы References

1. Lechevin J. C., Poche R. M. Activity of LM 2219 (Difethialone), a new anticoagulant rodenticide, in commensal rodents // Proceedings of the Thirteenth Vertebrate Pest Conference. 1988 (13): 59–63.

2. van Heerden P. S., Bezuidenhout B. C. B., Ferreira D. Improved synthesis for the rodenticides, diphenacoum and brodifacoum // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1. 1997: 1141–1146.

3. van Heerden P. S., Bezuidenhout B. C. B., Ferreira D. Efficient asymmetric synthesis of the four diastereomers of diphenacoum and brodifacoum // Tetrahedron. 1997. V. 53(17): 6045–6056.

4. Jung J.-C., Oh S. Practical synthesis of hydroxychromenes and evaluation of their biological activity // Molecules. 2012 V. 17: 240–247.

5. Jung J.-C., Jang S., Oh S., Park O.-S. Simple synthesis and biological evaluation of flocoumafen and its structural isomers // J. Chem. Sci. 2010. V. 122(6): 833–838.

6. Кочетов А. Н., Кузьмина Л. Г., Шестаков К. А. Пути создания новых антикоагулянтных родентицидов // Дезинфекционное дело. 2009. №2. С. 68–77. [Kochetov A. N., Kuz'mina L. G., Shestakov K. A. Ways of creations of new anticoagulant rodenticides // Disinfection affairs (ISSN 2076-457X). 2009 (2): 68–76] [In Russian].

7. Watt B. E., Proudfoot A. T., Bradberry S. M., Vale J. A. Anticoagulant rodenticides // Toxicol. Rev. 2005. V. 24(4): 259–269.

8. Dolmella A., Gatto S., Girardi E., Bandoli G. X-ray structures of the anticoagulants coumatetralyl

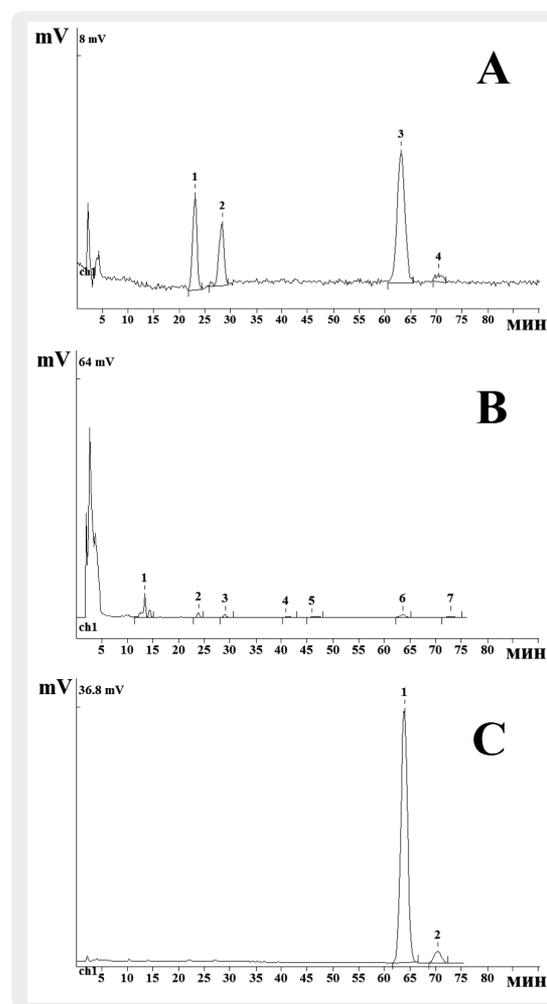


РИС. 1. Хроматограммы модельного раствора флокумафена 0.005 мг/мл – (пики 1, 2) и дифетиалона 0.005 мг/мл – (пики 3, 4) (А), растворов экстракта (изопропанол : H_2O : CH_3COOH = 40 : 10 : 0.1) из тестовой приманки («мягкие» брикеты) родентицидного средства «Тайфун-МБ»: 100 мг/мл (В) и экстракта (изопропанол) из дутового премикса: 40 мг/мл (С).
Подвижная фаза $\text{CH}_3\text{CN} : \text{H}_2\text{O} : \text{CH}_3\text{COOH}$ (75 : 25 : 1)

and chlorophacinone. Theoretical calculations and SAR investigations on thirteen anticoagulant rodenticides // J. Mol. Struct. 1999. V. 513: 177–199.

9. Mladenović M., Mihailović M., Bogojević D., Vuković N., Sukdolak S., Matić S., Nićiforović N., Mihailović V., Mašković P., Vrvic M. M. Solujić S. Biochemical and pharmacological evaluation of 4-hydroxychromen-2-ones bearing polar C-3 substituents as anticoagulants // Eur. J. Med. Chem. 2012. V. 54: 144–158.

10. Рябов С. В. Резистентность к антикоагулянтным родентицидам // Дезинфекционное дело. 2018. № 2. С. 45–54. [Ryabov S. V. Resistance of rodents to anticoagulants // Disinfection affairs (ISSN 2076-457X). 2018 (2): 45–54] [In Russian].

11. Hernandez-Moreno D., de la Casa-Resino I., Lopez-Beceiro A., Fidalgo L. E., Soler F., Perez-Lopez M. Secondary poisoning of nontarget animals in an ornithological zoo in Galicia (nw Spain) with anticoagulant rodenticides: a case report // *Vet. Medicina*. 2013. V. 58(10): 553–559.

12. Meiser H. Detection of anticoagulant residues by a new HPLC method in specimens of poisoned animals and a poison control case study // *J. Anal. Toxicol.* 2005. V. 29(9): 556–563.

13. Palazoglu M. G., Tor E. R., Holstege D. M., Galey F. D. Multiresidue analysis of nine anticoagulant rodenticides in serum // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46(10): 4260–4266.

14. Johnston J. J., Primus T. M., Goldade D. A. Solid phase extraction for the analysis of rodenticides in biological matrices // *Recent Res. Devel. In Agricult. Food Chem.* 1997. (1): 211–220.

15. Goldade D. A., Primus T. M., Johnston J. J., Zapien D. C. Reversed phase ion pair high-performance liquid chromatographic quantitation of difethialone residues in wholebody rodents with solidphase extraction cleanup // *J. Agric. Food Chem.* 1998. V. 46(2): 504–508.

16. Caruel H., Espana B., Lattard V., Benoit E. Composition comprising difethialone, rodenticide bait and method for controlling target rodent pests: WO 2015/189321 A1 // PCT/EP20 15/063028.

17. Андреев С. В., Беляев Е. С., Ищенко А. А. Новый универсальный метод для определения антикоагулянтов второго поколения в родентицидах // *Изв. вузов. Химия и хим. технология*. 2019. Т. 62. №1. С. 85–90. [Andreev S. V., Belyaev E. S., Ischenko A. A. New universal method for determination of anticoagulants in rodenticides // *Izv. Vyssh. Uchebn. Zaved. Khim. Khim. Tekhnol.* (ISSN 0579-2991). 2019. V. 62 (1): 85–90] [In Russian].

18. Bidny S., Gago K., David M., Duong T., Albertyn D., Gunja N. A validated LC-MS-MS method for simultaneous identification and quantitation of rodenticides in blood // *J. Anal. Toxicol.* 2015. V. 39: 219–224.

19. Fourel I., Damin-Pernik M., Benoit E., Lattard V. Coreshell LC-MS/MS method for quantification of second generation anticoagulant rodenticides diastereoisomers in rat liver in relationship with exposure of wild rats // *J. Chromatogr.* 2017. V. 1041-1042B: 120–132.

20. Taylor M. J., Giela A., Senior C., Sharp E. A., Titman C. M., Luzardo O. P., Suárez N. R. Multi-residue determination of anticoagulant rodenticides in vertebrate wildlife and domestic animals using ultra (high) performance liquid chromatography tandem mass spectrometry // *MethodsX*. 2018. V. 5: 149–158.

21. Adamowicz P., Kała M. LC-MS and LC-MS/MS determination of six anticoagulant rodenticides in

blood // *Probl. of Forens. Sci.* 2009. V. 77: 53–63.

22. 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 // *Химико-фармацевтический 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.].

23. Носикова Л. А., Кочетов А. Н. Анализ дифенакума в родентицидных композициях, содержащих производные куматетралила // *Тонкие химические 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].

24. 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].

25. Носикова Л. А., Кочетов А. Н. Оптимизация определения действующих веществ в инсектородентицидных средствах на основе фипронила с производными 4-гидроксикумарина методом ОФ ВЭЖХ // *Пест-Менеджмент*. 2018. №4. С. 22–29. [Novikova L. A., Kochetov A. N. 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 // *Pest management* (ISSN 2076-8462). 2018 (4): 22–29.] [In Russian].

26. Berny P. J., Buronfosse T., Lorgue G. Anticoagulant poisoning in animals: a simple new high-performance thinlayer chromatographic (HPTLC) method for the simultaneous determination of eight anticoagulant rodenticides in liver samples // *J. Anal. Toxicol.* 1995. V. 19: 576–580.

27. Hellinghausen G., Read E. R., Wahab M. F., Lee J. T., Lopez D. A., Weatherly C. A., Armstrong D. W. Mass spectrometry-compatible enantiomeric separations of 100 pesticides using core-shell chiral stationary phases and evaluation of iterative curve fitting models for overlapping peaks // *Chromatographia*. 2019. V. 82:221–233.

28. НДП 30.1:2:3.117-2012 Методика изменений массовых концентраций фенолов и хлорфенолов в питьевых, природных и сточных водах

методом хроматомасс-спектрометрии. М.: ЗАО «Роса», 2012. 24 с.

29. Improved sensitivity and dynamic range using the Clarus SQ 8 GC/MS system for EPA method 8270D semivolatile organic compound analysis [Электронный ресурс] Режим доступа http://www.perkinelmer.com/PDFs/Downloads/APP_EPAMethod8270D.pdf (дата обращения 15.01.2019).

30. US EPA Method 8260 with the Tekmar Lumin and the Agilent 7890B GC/5977A MS [Электронный ресурс] Режим доступа https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-9254EN_8260_Lumin_application.pdf (дата обращения 15.01.2019).

31. Hunter K., Sharp E. A., Newton A. Determination of diastereomers of bromadiolone, an anticoagulant rodenticide, in animal tissues by high-performance liquid chromatography // *J. of Chromatography*. 1988. V. 435:83–95.

32. 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.

33. 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.]

34. Miller G. P., Radomska-Pandya A., Moran J. H. Methods and compositions for detecting metabolites: US 2010/0273203 AI Pub. Date 28.10.2010.

35. 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., Суло 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].

To determine the isomeric composition difethialone in a rodenticides products by the method RP HPLC. From supplier evaluation to monitor preparative form

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.

Resume: Examples of determining difethialone in technical substance, washing powder, concentrate and ready rodenticides forms by the method RP HPLC. Implemented integration of an analytical method for the determination of difethialone in group method of determination homologues 4-hydroxycoumarin series. The selected conditions of chromatography in the isocratic elution mode allow to evaluate the isomeric composition of the substance as the most lipophilic object among those considered in the study. The conditions of extraction of various preparative forms is completely coincided with previously proposed for the evaluation of derivatives of 4-hydroxycoumarin number and include grain, hard and soft pellets, containing as matrix, foodgrade ingredients and paraffin. Found the conditions determining the isomer composition of the difethialone open wide possibilities for the harmonization of methods of analysis rodent/insectorodent means on the basis of homologues 4-hydroxycoumarins/tiocoumarins series and the implementation of evaluation procedures for suppliers or to establish the fact of falsification of products in case of replacement difethialone on a budget of substance.

Keywords: difethialone, anticoagulant rodenticides, Tocumen, coumatetralyl, bromadiolone, difenacoum, flocoumafен, brodifacoum, RP-HPLC, production control, evaluation of suppliers, counterfeit, isomeric forms, cis-, trans-, "pest control", the determination.