

Исследование строения химических соединений, методы анализа и контроль производства

© Коллектив авторов, 2012

А. Н. Кочетов¹, К. А. Шестаков¹, Г. М. Шпилевский¹, Л. Г. Кузьмина²

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ ЗАМЕЩЕННЫХ В ТРЕТЬЕМ ПОЛОЖЕНИИ 4-ГИДРОКСИКУМАРИНОВ В ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВАХ И ФАРМПРЕПАРАТАХ

¹ Испытательный лабораторный центр ГУП “Московский городской центр дезинфекции” (ИЛЦ ГУП МГЦД), Москва, Россия, E-mail: kochchem@mail.ru;

² Институт общей и неорганической химии РАН, Москва, Россия

Рассмотрены аспекты аналитического определения фармакологически активных производных ряда 4-гидроксикумарина, использующихся в терапевтических целях и в практике медицинской дезинфекции. Показана возможность совместного определения 6 производных данного ряда в различных объектах с использованием ОФ ВЭЖХ с УФ-детектированием.

Ключевые слова: 4-гидроксикумарины; ОФ ВЭЖХ; родентициды.

В 20-х годах прошлого века установлено, что причиной гибели крупного рогатого скота от кровотечений являются производные 4-гидроксикумарина (4-ГК), которые обнаружены в подгнившем клевере [1]. Однако только в начале 40-х годов удалось синтезировать аналоги природных соединений, которые обладали схожими характеристиками и были более технологичными [2, 3]. Практически с самого начала своего появления, синтетические антикоагулянты крови вызвали интерес исследователей возможностью использования как в терапевтических целях (для лечения и профилактики тромбозов, эмболий, тромбофлебита, инфаркта миокарда, стенокардии, ревматических пороков сердца [4]), так и, чуть позднее, применением в практике медицинской дезинфекции в качестве родентицидных субстанций [5, 6]. Наиболее токсичные синтетические производные со временем стали использоваться только как родентициды.

Отравленные приманки, дусты, пасты и микрокапсулированные средства на основе синтетических антикоагулянтов крови в настоящее время являются самыми распространенными средствами борьбы с грызунами [7]. Их преимущества по сравнению с ядами острого действия (Zn_3P_2 , α -нафтилтиомочевина и др.) – большой скрытый период действия (гибель зверьков наступает на 4 – 10 сут [8]), что не вызывает отпугивания грызунов от отравленных приманок, а также наличие антидота — витамина K_3 (“Викасол”), являющегося синтетическим аналогом витамина К [9], который может применяться при случайном отравлении антикоагулянтами людей или домашних животных.

Многочисленные научные изыскания позволили ввести в фармацевтическую практику как усовершенствованные подходы к модернизации существующих производных данной лекарственной группы (стереоселективные синтезы [10 – 15] или же разнообразные

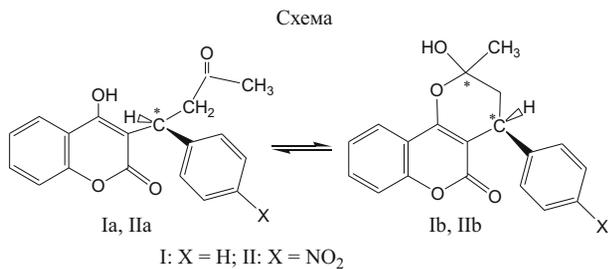
способы очистки и разделения рацемических смесей [16 – 31]), так и осуществлять поиск новых субстанций [5, 32 – 39].

В настоящее время в медицинской дезинфекции для управления численностью грызунов (“pest control”) [40] активно используются антикоагулянтные родентицидные композиции, в которых широко применяются в качестве действующих веществ (ДВ) непрямые антикоагулянты 4-ГК ряда (I, III – VII, рис. 1), ингибирующие фермент эпокси-редуктазу (витамин К редуктазу). Содержание ДВ в родентицидных средствах варьируется от 3,0 до 0,005 %. В инструкциях по применению таких средств обязательно включены методы контроля их качества, одним из которых является соответствие содержания ДВ в пределах, установленных нормативными требованиями.

В терапевтических целях на современном этапе используются — “Варфарин” (I) (Warfarex[®], Marevan[®]), его натриевая соль (Warfarine Nycomed[®]) [41] и нитропроизводное (II) — “Синкумар” (Acenocumarol[®], Synthrome[®], Trombostop[®]) (рис. 1), которые выпускаются в виде таблеток [42].

Определение содержания производных 4-ГК в различных объектах, как правило, осуществляют методом ВЭЖХ (реже капиллярным электрофорезом) с различными вариантами детектирования [43 – 60]. Высокие спектральные характеристики (в первую очередь за счет значительных величин коэффициента молярного поглощения) рассматриваемых соединений и/или проведение анализа флуоресцентными методами в некоторых случаях позволяют проводить анализ без использования сложного хроматографического оборудования [61 – 65].

Наиболее доступной, простой и применимой для широкого диапазона препаратов, с точки зрения лабораторного обеспечения, а также корректного опреде-



Кольчато-цепная таутомерия для кумаринов I и II

ления ДВ в родентицидах, является обращеннофазовая (ОФ) ВЭЖХ с УФ-детектированием. Однако в ряде методических указаний по анализу содержания ДВ введены существенно менее точные методы контроля: ТСХ и спектрофотометрия в УФ-области, применение которых позволяет провести быструю оценку с применением менее дорогостоящего оборудования [66]. Например, в качестве официального метода анализа таблетированных форм фармацевтических препаратов для данной лекарственной группы непосредственно в условиях производства предложен полуавтоматический метод, базирующийся на спектрофотометрии [67]. Описаны также и титриметрические способы определения II [68] и I [69], основанные на определении в водно-органических системах последних (как слабых кислот) с помощью раствора щелочи в присутствии в качестве индикатора бромтимолового синего и фенолфталеина соответственно. Несмотря на то, что экспрессность анализа и доступность оборудования играет не последнюю роль, все же подобный подход накладывает существенные ограничения на анализ препаратов, особенно содержащих несколько ДВ.

Анализ разнообразных композиций, содержащих производные 4-ГК, нанесенные на различные матрицы, условно можно разделить на 2 этапа: экстракционный (стадия пробоподготовки) и непосредственно ана-

Таблица 1
Экстрагенты, используемые при анализе производных 4-ГК

Матрица	Экстрагент	Определяемое соединение	Литература
Пшеничная мука	ДМФА	I	[70]
Кукурузная мука	CH ₃ CN	I	[71]
Вода	CH ₂ Cl ₂	I	[72]
Кровь	CH ₂ Cl ₂ : <i>i</i> -PrOH (95:5)	I, III	[73]
Дуст	CH ₃ CN:H ₂ O (50:50)	III	[7]
Таблетированные формы	ТГФ:MeOH:H ₂ O:AcOH (35:10:65:0,1)	I, II	[74]
Ткани животных	CHCl ₃ :ацетон (1:1)	I, III, V, VII	[43, 75 – 77]
	CH ₂ Cl ₂ :ацетон (1:1)	I, III, V – VII	[78]
Пищевые приманки	1,4-D:1 % Na ₄ P ₂ O ₇ водн. (85:15)	I	[79]
	CHCl ₃	I	[80]
	MeOH	VII	[7]

литический. Главной задачей нашего исследования была попытка выявления на различных примерах наиболее приемлемых условий экстракции, сочетающихся с максимально упрощенным вариантом разделения и детектирования производных данной группы. Исходя из литературных сведений, вкупе с собственными данными, базирующимися на анализе готовых и модельных композиций, нами предпринята попытка систематизировать имеющиеся сведения относительно влияния различных факторов на анализ многокомпонентных систем, содержащих исследуемые ДВ.

Одной из важных составляющих, влияющих на получение приемлемых аналитических данных, является выбор экстрагента, обеспечивающего (по возможности полностью) перевод ДВ в анализируемый раствор. Практика показывает отсутствие универсального экстрагента, позволяющего достичь полного извлечения ДВ из сложных матриц различного состава (табл. 1).

Исследования на модельных объектах экстракционных характеристик для системы октанол — вода не обнаруживают значительного влияния pH среды в широком диапазоне значений [46], вместе с тем степень извлечения из кислых сред (на примере II) уменьшается в ряду CHCl₃ – 1,2-ДХЭ — эфир — Вэ с 97 до 65 %, при этом добавление электролитов практически не оказывают значительного воздействия на экстракционные свойства [81].

Известно, что для соединений I и II, а также их аналогов (производные 4-ГК, у которых заместитель в положении 3 содержит кетогруппу, отделенную 2 метиленовыми группами от кумаринового цикла) проявляется кольчато-цепная таутомерия [82 – 86]. В этом случае в растворах обнаруживается равновесие между кето-формами и циклическими гемикетальными таутомерами (схема), а сдвиг равновесия зависит от природы растворителя. В кристаллическом состоянии данные соединения существуют исключительно в гемикетальной форме [87 – 91]. Показано на примере ряда органических растворителей преобладание циклических форм по типу Ib и IIb (до 95 % [92]) над ациклическими, при этом более кислые значения pH способствуют значительному смещению таутомерного равновесия в сторону циклических продуктов. В сильно щелочной среде равновесие смещается в сторону депротонированной кето-формы Ia и IIa, кристаллические фазы которых могут быть выделены в виде соответствующих солей [93 – 95]. Аналогично в щелочной среде ведут себя и гидроксикумарины III, VI и VII, для которых явление таутомерии, вследствие особенностей строения, отсутствует. Также не подвергается таутомерным превращениям исследованное нами производное IV — метиловый эфир циклической формы Ib, которое использовалось на практике для контроля численности грызунов [96], и метиловый эфир кето-формы Ia, получаемый альтернативными методами [3, 85]. Для соединений, существующих исключительно в циклической форме, аналогично IV, гемикетальный цикл может быть разрушен химическим путем, например при проведении кислого гидролиза в жест-

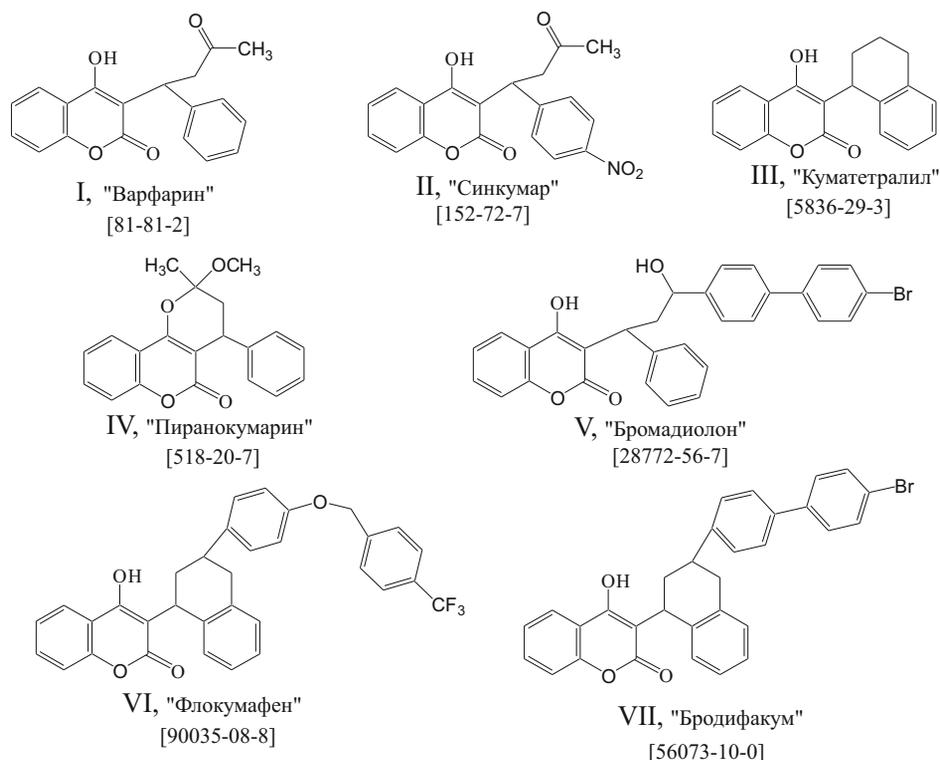


Рис. 1. Общие формулы исследованных производных ряда 4-ГК, их распространенные торговые названия и № CAS.

ких условиях, как это было установлено в случае 5-гидроксипроизводного IV [97]. Наличие альтернативной гидроксигруппы в положении 5 для последнего приводит к реализации внутримолекулярной водородной связи, стабилизирующей открытоцепочечные структуры, при этом выделено 5-гидроксипроизводное Ia. Теоретически соединение V (так же как и восстановленное производное Ia, отличающееся наличием гидроксигруппы вместо кето-группы [98]), не склонно к таутомерным превращениям, однако нельзя исключить вероятность существования в растворе внутримолекулярных водородных связей между гидроксигруппами кумаринового и ациклического фрагментов. Последнее обстоятельство может в значительной степени стабилизировать, в случае образования, псевдоциклическую структуру, несмотря на протекание обменных процессов с растворителем.

Таким образом, использование слабых или нейтральных условий при проведении непосредственно аналитической стадии хроматографического анализа производных 4-ГК позволяет, с одной стороны, уменьшить содержание открытоцепочечных форм по типу Ia, препятствуя возникновению образующихся при более высоких значениях pH анионных форм (что может приводить к усложнению конечных хроматограмм), а с другой — расширяет ассортимент растворителей для ОФ ВЭЖХ, которые могут быть использованы без опасности химического модифицирования (MeCN, MeOH, TGF). Следует отметить, что выбор органических растворителей подвижной фазы часто продиктован соотношением стоимости и токсичности. Оптимальным, по нашему мнению, растворителем

при проведении определения соединений I – VII методом ОФ ВЭЖХ является именно ацетонитрил.

Высокие спектральные характеристики производных 4-ГК [66] позволяют проводить прямое постколоночное детектирование практически во всем УФ-диапазоне без предварительной дериватизации. Этим обстоятельством объясняется разнообразие использованных исследователями дискретных значений длин волн УФ-детектора, например при анализе I: 330 нм [46], 311 нм [74], 283 нм [79], 280 нм [26, 70, 71]. Действительно, было показано, что максимум спектра поглощения этанольного раствора I в УФ-области при подкислении сдвигается с 310 до 281 нм [99], что может проиллюстрировать как выбор исследователями различных систем растворителей, так и служить наглядной демонстрацией влияния pH на таутомерное равновесие.

Ряд исследователей использует при аналитическом определении производных 4-ГК методом ОФ ВЭЖХ градиентное элюирование [43, 72, 75, 76]. Действительно, внедрение подобного технического приема в аналитическую практику позволяет заметно сократить время исследования, сэкономить дорогостоящие органические компоненты подвижной фазы и заметно улучшить разделение компонентов. Например, для производных 4-ГК становится возможным определение индивидуальных изомеров (диастереомеров) [19, 100]. Последнее обстоятельство не всегда оказывается востребованным при проведении рутинных измерений. При этом значительно повышаются требования к дополнительному (периферийному) оборудованию и двукратно увеличиваются затраты на

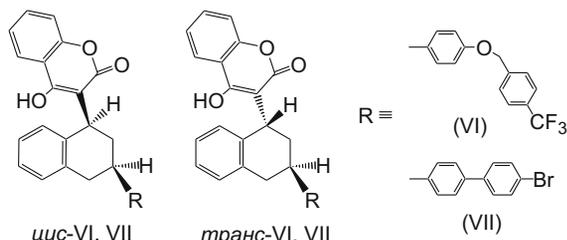


Рис. 2. Геометрические изомеры соединений VI и VII.

приготовление и очистку систем растворителей. По этим причинам мы отказались от применения подобного подхода. Однако применение даже выбранных нами, максимально упрощенных вариантов проведения разделения/детектирования, позволило уверенно проводить количественное определение геометрических (*цис*-, *транс*-) изомеров соединений VI и VII (рис. 2).

Останавливаясь на выборе подвижной фазы при анализе многокомпонентных систем на основе соединений I – VII, необходимо отметить, что их выбор, несмотря на кажущееся разнообразие, достаточно ограничен: органический растворитель (MeOH, AcCN, ТГФ), вода и кислота (соль) для поддержания определенного значения pH. Примерами могут служить следующие системы: MeCN — 0,1 M раствор $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (63:37) [45]; MeCN — 0,005 M раствор $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3\text{Na}$ (50:50) [71]; MeOH — 0,0025 N раствор H_3PO_4 (66:33) [79]; MeOH — 0,0055 M раствор $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{SO}_3\text{H}$ (60:40) [70]; ТГФ — MeOH — 0,1 % раствор AcOH (35:10:65) [74]. Наиболее оправдано, на наш взгляд, применение систем на основе MeCN с использованием водных растворов AcOH.

Экспериментальная часть

Для проведения исследований использовали следующие аналитические стандарты: “Варфарин” 97,5 % (СОП 64 – 06, НПК “Блок-1”, Россия), “Бродифакум” 97,8 % (СОП 68 – 06, НПК “Блок-1”, Россия), “Бромдиолон” 98,2 % (СОП 65 – 06, НПК “Блок-1”, Россия), “Куматетралил” 99,9 % (Bayer AG, Германия), “Флокумафен” 96,4 % (Kukbo Science Co., Ltd., Корея).

Аналитический стандарт кумарина II в виде этанольного сольвата был получен экстракцией действующего вещества из фармакопейного препарата “Синкумар” фирмы ICN (Венгрия) с последующей направленной кристаллизацией из этилового спирта [90].

Аналитический стандарт соединения IV был получен по модифицированному методу, описанному в работе [2], при этом в качестве прекурсора использовалось соединение I. Для приготовления стандартных растворов веществ II и IV (см. выше) использовались выделенные в процессе синтеза монокристаллические образцы, индивидуальность которых подтверждена методом РСТА (данные депонированы в Кембриджском банке структурных данных (КБСД) под регистра-

ционными номерами CCDC — 632044 и 673717 соответственно).

Этиловый спирт ректифицированный (техн., ГОСТ 18300–87), хлороформ (х.ч.) ТУ 6-09-06-800–76, ацетон (о.с.ч.) (ТУ 6-09-3513–86), метанол (х.ч.) ГОСТ 6995–77, 1,4-диоксан (х.ч.) ГОСТ 10455–80, гексан (х.ч.) ТУ 2631-003-05807999–96, уксусная кислота (х.ч.) ГОСТ 61–75, вода дистиллированная ГОСТ 6709–72, ацетонитрил (для ВЭЖХ, “Panreac”, Испания) и тетрагидрофуран (для синтеза, “BASF”, Германия) использовались без предварительной очистки.

Проведение ОФ ВЭЖХ в сочетании с УФ детекцией проводили на хроматографе “Waters 490” (Waters Ltd., Watford, UK), оснащенном насосом Altex модели 110А, инжектором “Rheodyne” с объемом петли 20 мкл и УФ-детектором модели 490 с переменной длиной волны. Использовали колонку из нержавеющей стали (4,0 × 150 мм), заполненную Сепарон SGX C18 Супер(RP-S), зернение 5 мкм (“Элсико”, Россия). Подвижная фаза ацетонитрил — вода — уксусная кислота, 70:30:0,5, скорость потока 0,5 мл/мин (предварительно дегазировали при помощи ультразвуковой установки). Детекцию осуществляли на УФ-детекторе при 280 и 310 нм. Запись хроматограмм проводили с помощью программы “Мультихром” (Ampersand Ltd. версия 1,52i, Россия). Калибровку проводили, используя ацетонитрильные растворы аналитических стандартов соединений I – VII с концентрациями: I — 18,4 мкг/мл, V — 18,9 мкг/мл, VII — 20,5 мкг/мл, смеси I, V и VII с концентрациями 6,13 6,30 и 6,83 мкг/мл соответственно (для экспериментальных тестовых композиций и зерновой приманки); I — 16,7 мкг/мл и VII — 14,5 мкг/мл (для парафинированных брикетов); II — 8,50 мкг/мл (для таблетированной формы); III — 5,22 мкг/мл (для дуста); VI — 5,40 мкг/мл, V — 4,33 мкг/мл и VII — 4,15 мкг/мл (для жидких концентратов), разбавленными в 2, 4 и 6 раз соответственно. Также в различных условиях хроматографирования подвергся исследованию раствор смеси I – VII с концентрациями компонентов: I — 0,954 мкг/мл (3,09 мкМ); II — 0,420 мкг/мл (1,19 мкМ); III — 1,44 мкг/мл (4,93 мкМ); IV — 1,25 мкг/мл (3,88 мкМ); V — 1,38 мкг/мл (2,62 мкМ); VI — 1,23 мкг/мл (2,27 мкМ); VII — 5,28 мкг/мл (10,1 мкМ).

В процессе исследований подвергались проверке на содержание соединений I – III, V – VII как экспериментальные композиции на основе пшеничного теста, так и ряд средств, имеющих государственную регистрацию на территории РФ. Промышленные образцы подверглись исследованию в химической лаборатории ИЛЦ ГУП МГЦД. Системы использованных для экстракции растворителей и результаты исследований представлены в табл. 2 (время экстракции 4 ч, температура — комнатная).

Анализ модельных тестовых композиций, содержащих соединения I, V, VII. Модельные приманки, содержащие индивидуальные ДВ, готовили в полимерной емкости, прибавляя порциями при перемешивании раствор, содержащий соединения I, V, VII и их

смесь, к композиции на основе пшеничной муки. Предварительно растворяли навески (0,050 г) соединений I, V, VII в 2,0 мл триэтиленгликоля и прибавляли при перемешивании к 30 г глицерина. Полученный раствор добавляли порциями при ручном перемешивании к предварительно гомогенизированной смеси пшеничной муки (58 г), яичного порошка (10 г) и ванилина (0,030 г). Определение ДВ осуществляли, помещая в коническую колбу (100 мл) 5–6 г тестовой композиции, взвешенную с точностью до четвертого знака после запятой, после чего прибавляли 10 мл дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре до полного распада образца (0,25 ч). Затем прибавляли 40 мл EtOH (*i*-PrOH) и 0,2 мл ледяной уксусной кислоты, после чего продолжали перемешивание в течение 4 ч. Экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) и хроматографировали. Альтернативно прово-

дили экстракцию с другими растворителями. Результаты анализа модельных систем представлены в табл. 2.

Анализ композиций. Аналогично осуществляли экстракцию из зерновой приманки “Родефакум” (ООО НПЦ “Родемос”, Россия), содержащей соединения VII, и парафиновых брикетов “Цунами комбо” (ООО “Алина Нова”, Россия), содержащих I и VII, а также инсектицид — фентион (0,05 %).

Анализ фармакопейного препарата “Синкумар” фирмы ICN (Венгрия) осуществляли по методу [74], за исключением использованного аналитического оборудования. В нашем случае использовался жидкостной хроматограф с УФ-детектором. Полученный по методу [74] экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента) и хроматографировали.

Извлечение (III) из родентицидного дуста “Ракумин 0,75 %” (Bayer AG, Германия), выполняли, используя в качестве экстрагента CHCl₃ (навеска средства массой 0,5 г в 50 мл последнего перемешивалась на маг-

Таблица 2

Результаты хроматографического исследования тестовых и промышленных образцов, содержащих I – VII

№ п/п	Матрица	ДВ	Содержание в исходном (нормативное значение)	Экстрагент	Обнаружено, %
1	Тесто (модель)	V	0,005 %	Ацетон : AcOH (50:0,2)	0,0012 ± 0,0004
2	Тесто (модель)	V	0,005 %	CHCl ₃ : H ₂ O : AcOH (30:30:0,5)	0,0008 ± 0,0004
3	Тесто (модель)	V	0,005 %	CH ₃ CN : H ₂ O : AcOH (70:30:0,5)	0,0016 ± 0,0004
4	Тесто (модель)	V	0,005 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0051 ± 0,0004
5	Тесто (модель)	V	0,005 %	<i>i</i> -PrOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0050 ± 0,0004
6	Тесто (модель)	I	0,005 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0052 ± 0,0004
7	Тесто (модель)	VII	0,005 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0048 ± 0,0004
8	Тесто (модель)	I	0,005 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0049 ± 0,0004
9	Тесто (модель)	V	0,005 %		0,0048 ± 0,0004
		VII	0,005 %		0,0050 ± 0,0004
		I	0,005 %	<i>i</i> -PrOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0049 ± 0,0004
		V	0,005 %		0,0050 ± 0,0004
		VII	0,005 %		0,0051 ± 0,0004
10	Зерновая приманка “Родефакум”	VII	0,005 ± 0,001 %	CHCl ₃	0,0006 ± 0,0004
11	Зерновая приманка “Родефакум”	VII	0,005 ± 0,001 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0016 ± 0,0004
12	Парафинированные брикеты “Цунами комбо”	I	0,005 ± 0,001 %	гексан : <i>n</i> -BuOH (35:10)	0,0048 ± 0,0004
		VII	0,005 ± 0,001 %		0,0038 ± 0,0004
13	Парафинированные брикеты “Цунами комбо”	I	0,005 ± 0,001 %	гексан : 1,4-Д (35:10)	0,0069 ± 0,0004
		VII	0,005 ± 0,001 %		0,0050 ± 0,0004
14	Парафинированные брикеты “Цунами комбо”	I	0,005 ± 0,001 %	гексан : CHCl ₃ (35:10)	0,0063 ± 0,0004
		VII	0,005 ± 0,001 %		0,0042 ± 0,0004
15	Парафинированные брикеты “Цунами комбо”	I	0,005 ± 0,001 %	гексан : <i>i</i> -PrOH (35:10)	0,0069 ± 0,0004
		VII	0,005 ± 0,001 %		0,0050 ± 0,0004
16	Парафинированные брикеты “Цунами комбо”	I	0,005 ± 0,001 %	EtOH : H ₂ O : AcOH (40:10:0,2)	0,0009 ± 0,0004
		VII	0,005 ± 0,001 %		0,0004 ± 0,0004
17	Таблетированная форма “Синкумар”	II	2 мг/таблетка	ТГФ : MeOH : H ₂ O : AcOH (35:10:65:0,1)	1,82 ± 0,10 мг/таблетка
18	Родентицидный дуст “Ракумин 0,75 %”	III	0,75 ± 0,05 %	CHCl ₃	0,790 ± 0,004
19	Родентицидный концентрат “Кукбо Ку-мафен”	VI	0,50 ± 0,05 %	CHCl ₃	0,479 ± 0,004
20	Родентицидный концентрат “Бром-БД”	V	0,25 ± 0,03 %	CHCl ₃	0,248 ± 0,004
21	Родентицидный концентрат “Ратикум”	VI	0,25 ± 0,03 %	CHCl ₃	0,252 ± 0,004

нитной мешалке (комнатная температура) в течение 4 ч, затем экстракт фильтровали через бумажный фильтр (белая лента), разбавляли в 5 раз AcCN и хроматографировали).

Анализ жидких родентицидных концентратов, содержащих препараты VI (“Кукбо Кумафен” (Kukbo Science Co., Ltd., Корея), V и VII (“Бром-БД” и “Ратикум” производства ООО “Валбрента Кемикалс”, Россия, соответственно) осуществлялся в близких условиях. Навеску средства массой 0,5 г (для VI и 1,0 г для V, VII) (с точностью до четвертого знака после запятой) помещали в мерную колбу (50 мл), доводили CHCl_3 до метки и тщательно перемешивали при комнатной температуре в течение 0,05 ч. Полученный раствор разбавляли в 40 раз AcCN и хроматографировали.

Результаты и их обсуждение

Опыт аналитического определения производных ряда 4-ГК показывает отсутствие универсальной системы растворителей, позволяющей проводить их выделение из всех возможных “матриц” (см. табл. 1). Таким образом, подбор экстрагента осуществляется, исходя из свойств “матриц” с учетом растворимости и возможных образований таутомерных форм. Следствием этого является нередко встречающееся практически полное отсутствие ДВ в экстрактах, выделенных из родентицидных средств, содержащих в качестве наполнителя и пищевого аттрактанта пшеничную (овсяную) муку и/или яичный порошок, а также парафин, при высокой биологической эффективности самих средств.

Приведенные в табл. 2 данные для модельных родентицидных смесей (ДВ — I, V и VII) в форме мягких брикетов на основе растительной муки и яичного порошка подтверждают низкие экстракционные характеристики для ряда систем (CHCl_3 , элюирующая смесь $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$ (70:30:0,5), ацетон с добавлением уксусной кислоты) при наличии высокой биологической (антикоагулянтной) активности исследуемых образцов. При этом при проведении экстракции системами $\text{EtOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$ (40:10:0,2); $i\text{-PrOH} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$ (40:10:0,2) в тех же исследуемых образцах найдены действующие вещества в количествах, соответствующих нормативным требованиям к исследуемым средствам — $(0,005 \pm 0,001) \%$. Данный эффект вызван, по-видимому, тем, что определяемые вещества связываются с белками, входящими в состав компонентов средств, например с яичным альбумином. Таким образом, при химико-аналитическом исследовании средств на основе растительной муки и/или яичного порошка в форме мягких брикетов, что обеспечивается наличием глицерина или триэтилглицероля, экстракцию оптимально проводить путем прибавления к навеске средства (5 г) 10 мл подкисленной дистиллированной воды и перемешиванием до гомогенизации образца, с последующим прибавлением EtOH или $i\text{-PrOH}$ до концентраций 75 – 85 %. Подобный подход позволяет добиться как высокой степени

гомогенизации образцов в процессе экстракции так и, очевидно, способствует денатурации белков, связывающих исследуемые производные 4-ГК. Известно, что антикоагулянты способны связываться с белками крови, например альбумином [101 – 103], что приводит к образованию соответствующих конъюгатов (белок — производное 4-ГК).

Аналогичные результаты получены при исследовании зерновой приманки (“Родефакум”). Использование в качестве экстрагента CHCl_3 приводит к неполному извлечению соединения VII, тогда как водно-спиртовые системы обеспечивают существенно лучшие результаты извлечения (табл. 2).

Другой подход к выбору экстрагента диктует “матрица” при анализе парафинированных брикетов. Использование подхода, аналогичного примененному при анализе приманок на основе пищевых продуктов, не приводит к желаемому результату. Проведенные исследования продемонстрировали необходимость сочетать при выборе экстрагента получение как высокой однородности образца в процессе экстракции за счет выбора растворителей, способных умеренно растворять парафин, так и быть пригодными для дальнейшего проведения анализа методом ОФ ВЭЖХ. Полученные результаты могут свидетельствовать, скорее, в пользу того, что наиболее эффективными являются системы, более адаптированные к присутствию значительных количеств воды при хроматографическом разделении, нежели обладающие более высокими экстракционными характеристиками за счет лучшего растворения компонентов используемого сырья на основе парафинов.

Более ожидаемые результаты были получены при анализе жидких концентратов, фармацевтического препарата и дуста. Присутствие в этих объектах, помимо незначительных количеств консервантов, достаточно ограниченного числа довольно простых соединений и/или растворителей существенно упрощает выбор экстрагента для извлечения производных 4-ГК из подобных “матриц” и, зачастую, не отходит от проверенных временем методов.

При проведении исследования модельных композиций, готовых средств и смеси соединений I – VII нами был выбран вариант, удовлетворяющий минимальным требованиям, как в части, касающейся аналитического оборудования, так и в плане доступности и безопасности используемых растворителей. Поскольку каждое из соединений I и II представлено в растворе в виде рацемической смеси (S,S; R,R; S,R; R,S) 4 циклических и 2 открытых форм (схема), понятно, что полное их разделение возможно только при создании специфических условий, отличных от рутинных измерений, с использованием нестандартных процедур, включая хиральные сорбенты и градиентное элюирование в комбинации с существенно более чувствительными детекторами, чем УФ. Подобная задача с разной степенью успешности решена в работах [19, 20], однако выполнение всех необходимых требований к проведению подобного анализа не позволяет рекомендовать дан-

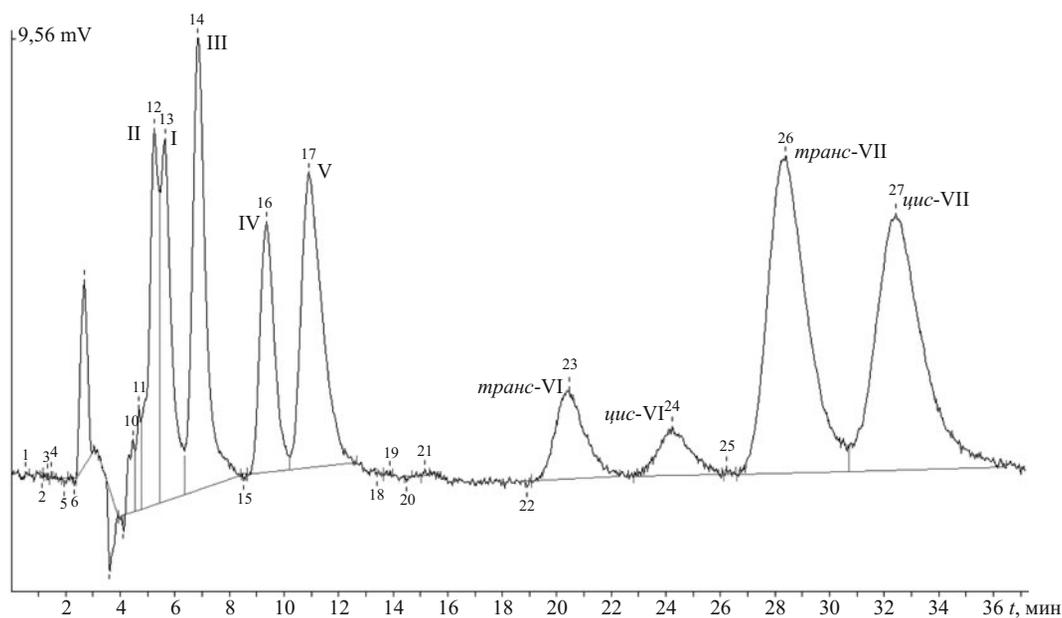


Рис. 3. Хроматограмма смеси соединений I – VII: I — 0,954 мкг/мл (3,09 мкМ); II — 0,420 мкг/мл (1,19 мкМ); III — 1,44 мкг/мл (4,93 мкМ); IV — 1,25 мкг/мл (3,88 мкМ); V — 1,38 мкг/мл (2,62 мкМ); VI — 1,23 мкг/мл (2,27 мкМ); VII — 5,28 мкг/мл (10,1 мкМ). Система $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O} - \text{AcOH}$ (70:30:0,5); детектирование при $\lambda = 280$ нм; скорость 0,5 мл/мин.

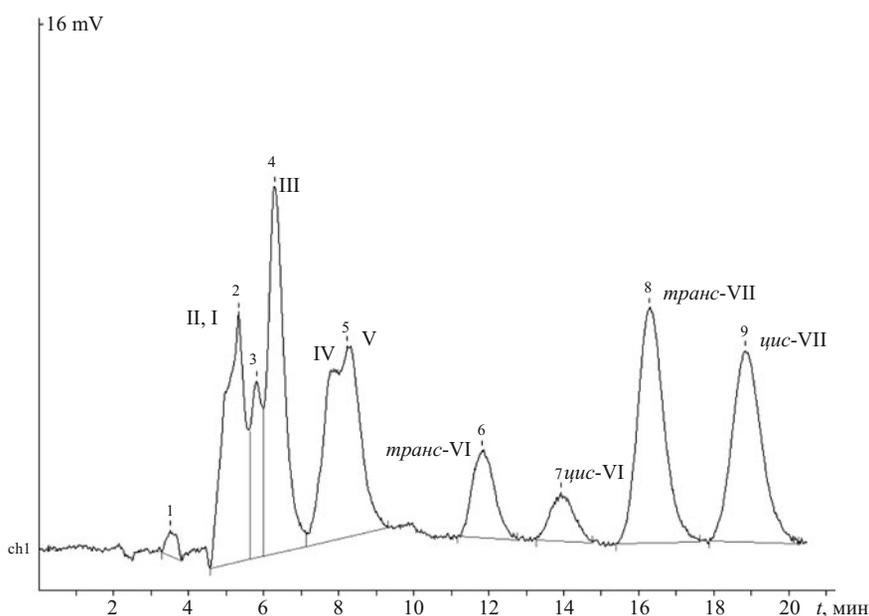


Рис. 4. Хроматограмма смеси соединений I – VII (см. рис. 3). Система $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (80:20); детектирование при $\lambda = 310$ нм; скорость 0,5 мл/мин.

ные подходы для повседневных измерений. В выбранных условиях (общий вид хроматограмм приведен на рис. 3, 4) компоненты I и II корректно не могут быть определены при совместном присутствии, однако можно утверждать, что при выполнении определения в “кислых” условиях создаются более предпочтительные условия как для детектирования индивидуальных соединений I и II, так и для их совместного определения на качественном уровне (рис. 3). При этом в “нейтральных” условиях (рис. 4) наблюдается значительное уширение групп сигналов, относящихся к соеди-

нениям I и II, и появляется дополнительный пик (пик 3 на рис. 4), что позволяет рекомендовать проведение исследований именно в “кислых” условиях.

Выбор длин волн, при которых проводилась детекция, обусловлен общими свойствами производных 4-ГК, а именно: 280 и 310 нм для “кислых” и “нейтральных” условий соответственно и, как показали исследования, не оказывает решающего значения ввиду близких спектральных характеристик рассмотренных производных. Также радикально не меняются параметры времени удерживания компонентов I и II при

Времена удерживания производных 4-ГК I – VII при различных условиях хроматографирования

№ п/п	Система, λ (нм), скорость потока (мл/мин)	Время удерживания, мин						
		II	I	III	IV	V	VI <i>транс/цис</i>	(VII) <i>транс/цис</i>
1.	CH ₃ CN — H ₂ O — AcOH (70:30:0,5), $\lambda = 280$ нм, 0,5 мл/мин	5,2	5,6	6,8	9,4	10,9	20,4/24,2	28,4/32,4
2.	CH ₃ CN — H ₂ O — AcOH (70:30:0,5), $\lambda = 280$ нм, 0,3 мл/мин	7,5	8,0	9,8	13,4	15,8	29,6/35,2	41,1/47,0
3.	CH ₃ CN — H ₂ O (80:20), $\lambda = 310$ нм, 0,5 мл/мин	5,3 ушир	5,3 ушир	6,2	8,0 ушир	8,4 ушир	11,8/13,9	16,3/18,8
4.	CH ₃ CN — H ₂ O (80: 0), $\lambda = 310$ нм, 0,3 мл/мин	7,6 ушир	7,7 ушир	9,0	11,2	12,3	17,6/20,8	24,2/28,1

применении меньшей скорости потока, равной 0,3 мл/мин, отличной от выбранного значения 0,5 (табл. 3).

Необходимо отметить, что применение систем с содержанием воды, большим чем 30 % по объему, может привести при, казалось бы, большем потенциале для разделения гомологов методом ОФ ВЭЖХ к негативным последствиям при анализе липофильных экстрактов, с чем мы столкнулись при исследовании композиций на основе парафина. При проведении хроматографического разделения с помощью градиентного элюирования можно рекомендовать для лучшего разделения компонентов I – V системы, близкие к использованной нами CH₃CN — H₂O — AcOH (70:30:0,5), а при исследовании негидрофобных систем даже увеличить полярность подвижной фазы (60:40:0,5) с последующим переходом к таким менее полярным системам, как система тех же растворителей, но в соотношении (80:20:0,5), что позволит сократить времена удерживания для наиболее липофильных соединений VI и VII. Применение подобного подхода несомненно положительно повлияет на улучшение разделения компонентов I – V, однако оно связано с привлечением более дорогостоящего оборудования и дополнительными затратами на приготовление сольвентов. Использование изократического режима с применением консервативного подхода к выбору подвижных фаз позволило нам добиться разделения геометрических изомеров VI и VII (рис. 2), хотя разделения *цис*-/*транс*-изомеров соединения V, зафиксированное, например, авторами [19], не удалось осуществить. Несмотря на тот факт, что определение соотношения изомеров не влияет на результат анализа, все же подобные сведения представляются крайне важными при входном контроле как самих субстанций, так и концентрированных растворов ДВ, используемых для приготовления готовых родентицидных композиций, поскольку позволяют оценить количество наиболее активного изомера и, следовательно, сделать вывод о качестве используемого сырья или установить его производителя.

Особо необходимо отметить сведения, полученные относительно соединения IV. Данное производное ранее использовалось в фармации [104], а также в качестве ДВ в родентицидных композициях [93], однако в

настоящее время широко не применяется. Между тем, ввиду увеличивающейся резистентности (устойчивости) к родентицидным средствам и, в первую очередь, к соединению I [105, 106], возможен возврат к практике широкомасштабного использования производных I (в том числе и соединения IV), чье применение ранее считалось экономически нецелесообразным.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что экстракцию производных 4-ГК из фармпрепаратов, растворов и дустов можно осуществлять с помощью таких растворителей, выбор которых определяется совокупностью физико-химических характеристик анализируемых соединений. В то же время экстракция из родентицидных средств, содержащих растительные компоненты (муку, зерно) и/или яичный порошок, необходимо производить растворителями, вызывающими денатурацию белков, например EtOH или *i*-PrOH в концентрации не менее 75 %. Непосредственно хроматографическое исследование (ОФ ВЭЖХ) оптимально проводить с применением “кислых” элюирующих систем на основе CH₃CN, например CH₃CN — H₂O — AcOH (70:30:0,5), обеспечивающих подавление образования таутомерных форм производных 4-ГК.

ЛИТЕРАТУРА

1. P. Griminger, *J. Nutr.*, **117**, 1325 – 1329 (1987).
2. M. A. Stahmann, I. Wolff, and K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc.*, **65**, 2285 – 2287 (1943).
3. M. Ikawa, K. P. Link, and M. A. Stahmann, *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 902 – 906 (1944).
4. H. G. Shetty, F. Woods, and P. A. Routledge, *J. Heart Valve Dis.*, **2**, 53 – 62 (1993).
5. B. E. Watt, A. T. Proudfoot, and S. M. Bradberry, *Toxicol. Rev.*, **24**(4), 259 – 269 (2005).
6. J. A. O'Connor, *Research. (London)*, **1**, 334 – 336 (1948).
7. В. К. Мелков, Л. Н. Румянцева и В. Ф. Колков (ред), *Рынок родентицидов в России*, Проект, Москва (2003), с. 328.
8. N. Back, R. Steger, J. M. Glassman, *Pharmacol. Res. Commun.*, **10**(5), 445 – 452 (1978).
9. М. Д. Машковский, *Лекарственные средства*, Т. 2, Медицина, Москва (1994), сс. 38, 688.
10. O. S. Park, and B. S. Jang, *Arch. Pharm. Res.*, **18**(4), 277 – 281 (1995).
11. G. Cravotto, G. M. Nano, G. Palmisano, and S. Tagliapietra, *Tetrahedron: Asym.*, **12**, 707 – 709 (2001).

12. A. Robinson, and H.-Y. Li, *Tetrahedron Let.*, **37**(46), 8321 – 8326 (1996).
13. C. E. Cook, C. R. Tallent, N. H. Ballentine, et al., *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **16**(4), 623 – 631 (1978).
14. N. Halland, T. Hansen, and K. A. Jørgensen, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 4955 – 4957 (2003).
15. W. R. Porter, K. Kunze, E. J. Valente, and W. F. Trager, *J. Label. Comp. Radiopharm.*, **17**(6), 763 – 773 (1979).
16. W. Dieterle, J. W. Faigle, C. Montigel, et al., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **11**, 367 – 375 (1977).
17. P. S. van Heerden, B. C. B. Bezuidenhout, and D. Ferrera, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1141 – 1146 (1997).
18. L. Gavati, M. Dinescu, F. Iohan, and A. B. Susan, *J. Radioanal. Chem.*, **2**, 435 – 438 (1969).
19. K. Hunter, E. A. Sharp, and A. Newton, *J. Chromatogr., Sect. A.*, **435**, 83 – 95 (1988).
20. I. Fitos, and M. Simonyi, *J. Chromatogr.*, **450**, 217 – 220 (1988).
21. B. West, S. Preis, C. H. Schroeder, and K. P. Link, *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2676 – 2779 (1961).
22. J. X. D. Vries, and U. Volker, *J. Chromatogr.*, **493**, 149 – 156 (1989).
23. G. L. Jeyaraj, and W. R. Porter, *J. Chromatogr.*, **315**, 378 – 383 (1984).
24. Y. Okamoto, R. Aburatani, K. Hatano, and K. Hatada, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**(9 – 10), 2147 – 2163 (1988).
25. Y. Sato, and Y. Suzuki, *Chem. Pharm. Bul.*, **33**(10), 4606 – 4609 (1985).
26. P. Erlandsson, L. Hansoon, and R. Isaksson, *J. Chromatogr.*, **370**, 475 – 483 (1986).
27. H. Solni, M. Stefansson, M.-L. Rlekkola, and M. V. Novotny, *Anal. Chem.*, **66**(20), 3477 – 3484 (1994).
28. D. W. Armstrong, E. Y. Zhou, S. Chen, et al., *Anal. Chem.*, **66**(23), 4278 – 4282 (1994).
29. J. Zheng and S. A. Shamsi, *J. Chromatogr., Sect. A.*, **1005**, 177 – 187 (2003).
30. L. A. Svensson, P. K. Owens, *Analyst*, **125**, 1037 – 1039 (2000).
31. J. X. de Vries, E. Schmitz-Kummer, *J. Chromatogr.*, **644**, 315 – 320 (1993).
32. Holbrook, J. A. Pereira, R. Labiris, et al., *Arch. Intern. Med.*, **165**(10), 1095 – 1106 (2005).
33. T. P. Baglin, D. M. Keeling, and H. G. Watson, *Br. J. Haematol.*, **132**(3), 277 – 285 (2006).
34. R. A. Lipton, and E. M. Klass, *J. Am. Med. Assoc.*, **252**, 3004 – 3005 (1984).
35. S. Stanchev, V. Hadjimitova, T. Traykov, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **44**, 3077 – 3082 (2008).
36. Z. N. Siddiqui, M. Asad and S. Praveen, *Med. Chem. Res.*, **17**, 318 – 325 (2008).
37. D. U. Chen, P. Y. Kuo, and D. Y. Yang, *Bioorg. Med. Chem. Let.*, **15**(10), 2665 – 2668 (2005).
38. M. Gebauer, *Bioorg. Med. Chem.*, **15**(6), 2414 – 2420 (2007).
39. A. Dolmella, S. Gatto, E. Girardi, and G. Bandoli, *J. Mol. Struct.*, **513**, 177 – 199 (1999).
40. В. А. Рыльников, *Дезинфекц. дело*, **2**, 57 – 60 (2008).
41. Справочник Видаль, *Лекарственные препараты в России: Справочник*, АстраФармСервис, Москва (2011), с. 1728.
42. А. Т. Бурбелло, А. В. Шабров, *Новейшая энциклопедия современных лекарств*, ОЛМА Медиа Групп, Москва (2011), сс. 165, 1152.
43. K. Hunter, and E. A. Sharp, *J. Chromatogr.*, **437**(1), 301 – 305 (1988).
44. U. P. Magne, K. Gry, L. P. Eysteine, and K. Stener, *Ther. Drug. Monit.*, **7**(3), 320 – 335 (1985).
45. J. M. Steyn, H. M. Van Der Merwe, and M. J. De Kock, *J. Chromatogr.-Biomed. Appl.*, **378**(1), 254 – 260 (1986).
46. G. W. F. Van Der Jansen and H. M. Lambert, *Int. J. Pharm.*, **12**(2 – 3), 231 – 249 (1982).
47. M.-C. Jin, X.-H. Chen, and Y. Zhu, *J. Chromatogr., Sect. A.*, **1155**(1), 57 – 66 (2007).
48. B. Kammerer, R. Kahlich, M. Ufer, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **383**, 909 – 917 (2005).
49. M.-C. Jin, Y.-P. Ren, X.-M. Xu, and X.-H. Chen, *Forensic Sci. Int.*, **171**(1), 52 – 56 (2007).
50. V. Vandebroucke, N. Desmet, P. De Backer, and S. Croubels, *J. Chromatogr., Sect. B.*, **869**(1 – 2), 101 – 110 (2008).
51. F. Guan, A. Ishii, H. Seno, et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **21**(1), 179 – 185 (1999).
52. Y. Gaillard, and G. Pépin, *J. Chromatogr., Sect. A.*, **763**(1 – 2), 149 – 163 (1997).
53. A. Medvedovici, F. David, P. Sandra, *Talanta*, **44**(9), 1633 – 1640 (1997).
54. A. J. Kieboom, and C. G. Rammel, *Bul. Environ. Contam. Toxicol.*, **26**, 674 – 678 (1981).
55. K. G. Koubek, J. P. Ussary, and R. E. Saulsee, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **62**, 1297 – 1301 (1979).
56. S. H. Lee, L. R. Field, W. N. Howard, and W. F. Trager, *Anal. Chem.*, **53**, 467 – 471 (1981).
57. D. E. Mundy, and A. F. Machin, *J. Chromatogr.*, **234**, 427 – 435 (1982).
58. D. E. Mundy, and A. F. Machin, *J. Chromatogr.*, **139**, 321 – 329 (1977).
59. D. E. Mundy, M. P. Quick, and A. F. Machin, *J. Chromatogr.*, **121**, 335 – 342 (1976).
60. Y. Guo, P. Weller, E. Farrell, et al., *Nat. Biotechnol.*, **24**(5), 531 – 536 (2006).
61. J. J. Vandelli and E. M. Schulman, *Anal. Chem.*, **56**(6), 1030 – 1033 (1984).
62. Y. S. Syang, A.-A. Ebenezer, and O. Selma, *Analyst*, **109**(8), 1019 – 1023 (1984).
63. E. Asafu-Adjaye and S. Y. Su, *Anal. Chem.*, **58**(3), 539 – 543 (1986).
64. G. E. Caissie and V. V. Mallet, *J. Chromatogr.*, **117**(1), 129 – 136 (1976).
65. C.-E. Ha, Ch. E. Petersen, D. S. Park, K. et al., *J. Biomed. Sci.*, **7**, 114 – 121 (2000).
66. С. У. Крейнгольд, *Практическое руководство по химическому анализу дезинфекционных препаратов*, Экспресс-принт, Москва (2002), сс. 119 – 128.
67. R. E. Kolinski, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **58**(1), 80 – 84 (1975).
68. L. Roman, R. Crăciuneanu, E. Florean, et al., *Farmacia*, **23**(2), 89 – 95 (1975).
69. ФС 42-490-72.
70. R. I. Perez, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**(2), 353 – 365 (1983).
71. S. Akhtar and L. C. Bailey, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **68**(6), 1130 – 1142 (1985).
72. Th. A. Bellar and W. L. Budde, *Anal. Chem.*, **60**(19), 2076 – 2083 (1988).
73. M. Gergov, I. Ojanperä, and E. Vuori, *J. Chromatogr., Sect. B.*, **795**, 41 – 53 (2003).
74. E. Moore and C. Lau-cam, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **69**(4), 629 – 632 (1986).
75. K. Hunter, *J. Chromatogr.*, **270**, 277 – 283 (1983).
76. K. Hunter, *J. Chromatogr.*, **270**, 267 – 276 (1983).
77. K. Hunter, *J. Chromatogr.*, **321**, 255 – 272 (1985).
78. A. Jones, *Bul. Environ. Contam. Toxicol.*, **56**, 8 – 15 (1996).
79. T. Billings, A. R. Hanks, and M. Billy, *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.*, **59**(5), 1104 – 1108 (1976).
80. J. L. Almeda, L. T. Savoy, and Ch. Higashi, *Arq. Inst. Biol.*, **51**(1 – 4), 5 – 6 (1985).
81. Н. К. Федущак, *Автореф. дис. канд. фарм. наук*, Львов (1984).
82. E. J. Valente and W. F. Trager, *J. Med. Chem.*, **21**(1), 141 – 143 (1978).
83. W. F. Trager and D. H. Larry, *J. Med. Chem.*, **27**(8), 1092 – 1094 (1984).
84. D. D. Gianini and J. D. Roberts, *Proc. Nat. Acad. U. S. A.*, **71**, 4221 – 4223 (1974).
85. E. J. Valente, E. C. Lingafelter, W. R. Porter, and W. F. Trager, *J. Med. Chem.*, **20**(11), 1489 – 1493 (1977).

86. K. K. Chan, D. D. Giannini, A. H. Cain, et al., *Tetrahedron*, **33**, 899 – 906 (1977).
87. G. Bravic, J. Gaultier, and C. Hauw, *Acad. C. R., Paris. Sér. C.*, **277**, 1215 – 1218 (1973).
88. E. J. Valente, W. F. Trager, and L. H. Jensen, *Acta Cryst. Sect. B.*, **31**, 954 – 960 (1975).
89. G. Ruggiero, O. P. Jr, and E. J. Valente, *Acta Cryst. Sect. C.*, **45**, 1740 – 1743 (1989).
90. А. Н. Кочетов, Л. Г. Кузьмина, *Кристаллография*, **52**(4), 662 – 665 (2007).
91. А. Н. Кочетов, Л. Г. Кузьмина, *Хим.-фарм. журн.*, **44**(2), 9 – 14 (2010).
92. Г. М. Вишнякова, Т. В. Смирнова, Л. Н. Курковская, А. Ю. Панов, *Изв. Вуз. Сер. химия, хим. технол.*, **29**(3), 111 – 113 (1986).
93. C. F. Hiskey and V. Melnitchenko, *J. Pharmac. Sci.*, **54**(9), 1298 – 1302 (1965).
94. A. R. Sheth, W. W. Brennesel, V. G. Young, et al., *J. Pharmac. Sci.*, **93**(11), 2669 – 2680 (2004).
95. A. R. Sheth, V. G. Young, and D. J. W. Grant, *Acta Cryst. Sect. E.*, **58**, m197 – m199 (2002).
96. J. M. Kennedy (ed.), *The Agrochemical Handbook*, Unwin Brothers Limited, Old Woking, Surrey (1987).
97. B. Castleberry, E. J. Valente, and D. S. Eggleston, *J. Crystal. Spectr. Res.*, **20**(6), 583 – 593 (1990).
98. G. L. Jeyaraj, and W. R. Porter, *J. Heterocycl. Chem.*, **22**(2), 535 (1985).
99. Metodă pentru determinarea spectrofotometrică în ultraviolet a varfarinei: патент CPP 62198: G01 № 2100 / V. Giuran; Central de chimie. — № 62198; applic. 24.04.73; patented. 14.06.77.
100. M. J. Kelly, J. Chambers, and A. D. MacNicoll, *J. Chromatogr.*, **620**, 105 – 112 (1993).
101. W. D. Wosilait, *Comp. Gen. Pharmacol.*, **3**(9), 83 – 88 (1972).
102. N. A. Brown, and W. F. Mueller, *Pharmacology*, **17**(4), 233 – 238 (1978).
103. C.-E. Ha, C. E. Petersen, D. S. Park, et al., *J. Biomed. Sci.*, **7**, 114 – 121 (2000).
104. L. Brunton, L. Lowenstein, and L. Shapiro, *J. Canad. Med. Assoc.*, **73**(9), 392 – 395 (1955).
105. H.-J. Pelz, S. Rost, M. Hünerberg, et al., *Genetics*, **170**(8), 1839 – 1847 (2005).
106. А. Н. Кочетов, К. А. Шестаков, Л. Г. Кузьмина, *Дезинфекц. дело*, **2**, 68 – 77 (2009).

Поступила 23.12.11

PECULIARITIES OF DETERMINATION OF THE CONTENT OF 3-SUBSTITUTED 4-HYDROXYCOUMARINS IN DISINFECTANTS AND DRUGS

A. N. Kochetov¹, K. A. Shestakov¹, G. M. Shpilevskii¹, and L. G. Kuz'mina²

¹ Moscow City Center for Disinfection, Moscow, 129337 Russia

² Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Russia

* e-mail: kochchem@mail.ru

Specific features of the analytical determination of pharmacologically active derivatives of the 4-hydroxycoumarin series, which are used in therapeutic and medical disinfection practice, are considered. The possibility of jointly determining six derivatives of this series in various objects using reverse-phase HPLC with UV detection is shown.

Key words: 4-hydroxycoumarins, reverse-phase HPLC, rodent control