

O. O. Novohatska, D. S. Milohov, O. P. Vavrinevych, S. T. Omelchuk, A. M. Antonenko  
HYGIENE AND ECOLOGY INSTITUTE  
OF O. BOHOMOLETS NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY, KYIV

## ANALYTICAL SUPPORT OF HYGIENIC CONTROL OF OXATHIPIPROLIN RESIDUAL AMOUNTS IN ENVIRONMENTAL OBJECTS AND POTATOES

**Introduction.** Providing of analytical control over the application of pesticides in environmental objects and agricultural products – is a mandatory component of preregistration studies of new compounds. The most common method for the control of pesticides application in the Ukraine is high performance liquid chromatography.

**The aim of the study** – to develop analytical methods for oxathiapirolin determination in the air, water, soil and potatoes for hygiene monitoring of compliance with hygienic standards in the environment and agricultural raw materials.

**Research Methods.** Oxathiapirolin – is a compound from new piperidinyl-thiazole-isoxazolines chemical class. For investigation the HPLC method was used.

**Results and Discussion.** Optimal conditions of oxathiapirolin chromatography were established: mobile phase – acetonitrile mixture + bidistilled water (75+25), UV detector wavelength – 260 nm, thermostat column temperature – 30 °C. Retention time – 4.6±0.1 minutes. Linear detection range is 0.5–10.0 mg/ml. Dependence of calibration area (S) peaks of the substance on its concentration (ρ) described by linear regression equation:  $S_{\text{oxathiapirolin}} = 272.4 + 36315.7 \times \rho$ .

The best results are obtained when concentrating the air on a filter paper “blue ribbon” followed by extraction with acetone. When choosing extractants to oxathiapirolin determination in water, the best result obtained with ethylacetate; soil – with acetone, potatoes – with a mixture of acetonitrile + 0.5 % aqueous phosphoric acid, followed by purification of extracts by adsorption.

**Conclusions.** Thus, developed analytical methods meet modern requirements, are selective and allow to control oxathiapirolin content in water at detection limit level – 0.002 mg/dm<sup>3</sup>, air of working zone – 0.2 mg/m<sup>3</sup>, atmosphere air – 0.003 mg/m<sup>3</sup>, soil – 0.03 mg/kg, potato – 0.003 mg/kg.

KEY WORDS: oxathiapirolin; liquid chromatography; air; water; soil; potatoes.

INTRODUCTION. Providing of analytical control over the application of pesticides in environmental objects and agricultural products – is a mandatory component of preregistration studies of new chemical plant protection products.

On the pesticide market new compound oxathiapirolin has appeared. The substance belongs to new piperidinyl-thiazole-isoxazoline chemical class pesticides with new mode of action. It effectively inhibits the growth of mycelium, has exceptionally oomycete activity and causes inhibition of oxysterol-binding proteins [1, 2].

Specialists of the Institute of Plant and Environmental Protection, Peking Academy of Agriculture and Forestry Sciences developed efficient and sensitive method for quantification of oxathiapirolin residual amounts in foods using ultra performance liquid chromatography coupled with mass spec-

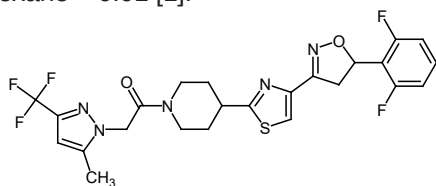
© O. O. Novohatska, D. S. Milohov, O. P. Vavrinevych, S. T. Omelchuk, A. M. Antonenko, 2017.

trometry [3]. Expensive equipment and complexity of this method realization limit its use in Ukraine. Therefore, the most common for pesticides application control is a method of high performance liquid chromatography (HPLC) [4–6].

Given the above, the aim of the study – to develop analytical methods for oxathiapirolin determination in the air, water, soil and potatoes for hygiene monitoring of compliance with hygienic standards in the environment and agricultural raw materials during the application of fungicides based on piperidinyl-thiazole-isoxazolines.

RESEARCH METHODS. Oxathiapirolin – 1-(4-{4-[(5RS)-5-(2,6-difluorophenyl)-4,5-dihydro-1,2-oxazol-3-yl]-1,3-thiazol-2-yl}-1-piperidyl)-2-[5-methyl-3-(trifluoromethyl)-1H-pyrazol-1-yl]ethanone. Molecular weight: 539.52. Vapor pressure Pa, (20 °C): 1.141×10<sup>-6</sup>. Solubility in water, g/l (20 °C): 1.75×10<sup>-4</sup>. Octanol/water partition coefficient

(log  $K_{ow}$ , 20 °C): 3.6. Solubility in organic solvents, g/l (20 °C): acetonitrile – 129.9; ethanol – 13.5; acetone – 162.8; ethylacetate – 33.9; dichloromethane – 352.9; o-xylene – 5.8; n-octanol – 0.03; n-hexane – 0.01 [1].

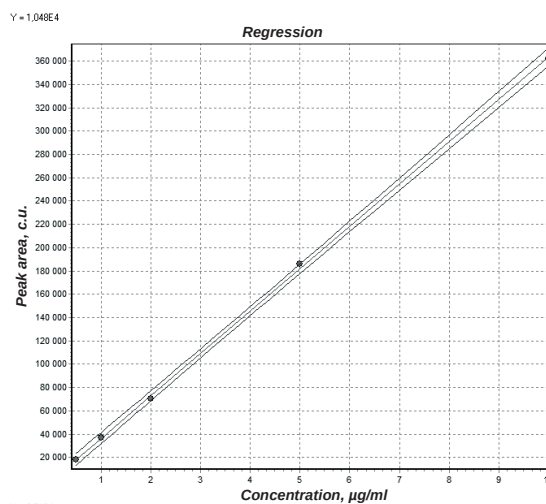


For investigation the HPLC method was used.

**RESULTS AND DISCUSSION.** On the first stage of the study we conducted a series of experiments to establish optimal conditions for oxathiapiprolin chromatography, given in Table 1. In the selection of the mobile phase, a series of studies in acetonitrile+bidistilled water systems in various combinations (85+15, 75+25 and 65+35, vol.+vol.) were conducted. To determine the optimal wavelength detection, we studied wavelength range from 220 to 300 nm.

On the next stage of research calibration curve was constructed (Fig. 1), range in which there is a linear relationship between peak area and oxathiapiprolin concentration was determined. Calibration curve was constructed in accordance with international standard [7].

Also, we conducted a series of laboratory experiments on the selection of extractants for the removal of the substance from the air, water, soil, potatoes samples and determining of the most effective way of extracts samples purification. At the stage of extractants selection the following organic solvents have been used – methanol, acetonitrile, acetone, chloroform, hexane, ethylacetate, dichloromethane, and combinations thereof.



Performer	HEI of NMU
Analysis	Oxathiapiprolin calibration curve
Regression	a + bx
a=	272.436
b=	36315.7
Statistical deviation of method	0.073835
Residue dispersion	2681.37
Variation coefficient, %	1.99554
Data linearity	satisfactory
Dispersion evenness	satisfactory
Correlation coefficient	0.999868

Fig. 1. Oxathiapiprolin calibration curve.

As a result of the studies optimal conditions for extraction and purification, which provide selective removal of the test compound from matrices without impurities that interfere with chromatographic determination were set.

Air samples were taken on various sorption materials; the best results are obtained when concentrating the air on a filter paper “blue ribbon”. After oxathiapiprolin concentration from air on sorp-

Table 1 – Conditions of oxathiapiprolin chromatography

Characteristics of the determination method	Oxathiapiprolin
Chromatograph	Liquid Chromatograph “Shymadzu”
Detector	UV detector
Column	steel chromatographic (250×4.6) mm filled with Nucleosyl C <sub>18</sub> (100–5)
Precolumn	steel chromatographic (4×3) mm filled with Nucleosyl C <sub>18</sub> (100–5)
Mobile phase	mixture of acetonitrile + bidistilled water (75+25, vol+vol)
Mobile phase flow rate, ml/min	1.0
UV detector wavelength, nm	260
Temperature of thermostat column, °C	30
Volume of liquid chromatograph loop injector, ml	20
Retention time under these conditions, minutes	4.6±
Linear range of detection, µg/ml	0.5–10.0
The dependence of the oxathiapiprolin chromatographic peak areas (c.u.) on its concentration in the calibration solution (µg/ml)	$S_{\text{oxathiapiprolin}} = 272.4 + 36315.7 \times p$

tion materials, the best extraction of material from sorbent was carried out with acetone.

When choosing extractants to oxathiapiprolin determination in water, the best result obtained with ethylacetate. Best oxathiapiprolin extraction from soil samples was carried out with acetone, potatoes – with a mixture of acetonitrile + 0.5 % aqueous phosphoric acid, followed by purification of extracts by means of adsorption chromatography (Table 2).

The obtained extracts of air and water samples after extraction and purification were dried with anhydrous sodium sulfate 20–25 g by infusion in a conical flask of 250 ml volume for 30 minutes. The extract was filtered through a filter “red tape” in the pear-shaped flask for solvent distillation with a capacity 250 ml, sodium sulfate and filter were washed with 20 ml of extractant. Eluates from soil and potato samples were collected in pear-shaped flask for solvent distillation (50–100 ml). The combined extracts and eluates was evaporated on a

rotary evaporator at water bath temperature no higher than 40 °C to volume 0.2–0.3 ml. The solvent residue was evaporated on air. The dry residue was quantitatively transferred to a graded test tube with a 10 ml capacity using acetonitrile. The final volume of the extract of air, water and soil samples was 2 ml potatoes – 1 ml.

Chromatograms of various samples extracts with oxathiapiprolin introduction to the water on level – 0.005 mg/dm<sup>3</sup>, air working zone – 0.5 mg/m<sup>3</sup>, atmosphere air – 0.008 mg/m<sup>3</sup>, soil – 0.1 mg/kg, potatoes – 0.1 mg/kg are shown in Fig. 2.

Metrological characteristics of oxathiapiprolin determination in environmental objects and agricultural raw materials by HPLC are given in Table 3.

According to the data given in the Table 3, the average oxathiapiprolin determination value in the study of various matrices was not less than 70 %, corresponding to modern requirements for guidance [8].

Table 2 – Conditions of water, air, soil and potatoes sample preparation for oxathiapiprolin determination using chromatographic methods

Studied object	Sample, g(ml)	Sample preparation phase	
		Extraction	purification
Air of working zone (“blue ribbon” filter)	4.0 l	acetone, 2×30 ml, each time during 30 minutes	not necessary
Atmosphere air (“blue ribbon” filter)	250.0 l		
Water	400.0	ethylacetate, 3×50 ml, each time during 1–2 minutes	not necessary
Soil	20.0	acetone, 2×50 ml, each time during 30 minutes	solid phase extraction (glass column (300×8) mm with floryzyl PR), elution hexane + acetone (7+3, vol.+vol.) 1×25 ml
Potato	50.0	acetonitrile + 0.5 % aqueous solution of phosphoric acid (2+1, vol.+vol.) during 30 minutes + 50 g NaCl during 30 minutes	solid phase extraction (glass column (300×8) mm with floryzyl PR), elution hexane + acetone (7+3, vol.+vol.) 1×40 ml

Table 3 – Metrological characteristic of methods for oxathiapiprolin determination in environmental objects and agricultural raw materials by HPLC

Studied object	LOQ*, mg/m <sup>3</sup> , mg/dm <sup>3</sup> , mg/kg	DL*, mg/m <sup>3</sup> , mg/dm <sup>3</sup> , mg/kg	Measurement range, mg/m <sup>3</sup> , mg/dm <sup>3</sup> , mg/kg	Mean value of determination, R, %	Standard deviation (n=12), S, %	Confidence interval, (P=0.95), ± %
Air of working zone	0.5	0.2	0.5–5.0	91.2	1.3	3.5
Atmosphere air	0.008	0.003	0.008–0.08	91.0	1.3	3.5
Water	0.005	0.002	0.005–0.05	89.2	4.2	2.7
Soil	0.1	0.03	0.1–1.2	81.1	5.0	3.2
Potato	0.01	0.003	0.01–0.12	75.3	5.2	3.3

Note. \* – LOQ – limit of quantification, DL – limit of detection.

CONCLUSIONS. Thus, developed analytical methods meet modern requirements, are selective and allow to control oxathiapiprolin content in different objects and can be used for air of working

zone, atmosphere air, water and soil safety control during the application of pesticides based on piperidinyl-thiazole-isoxazoline class compound.

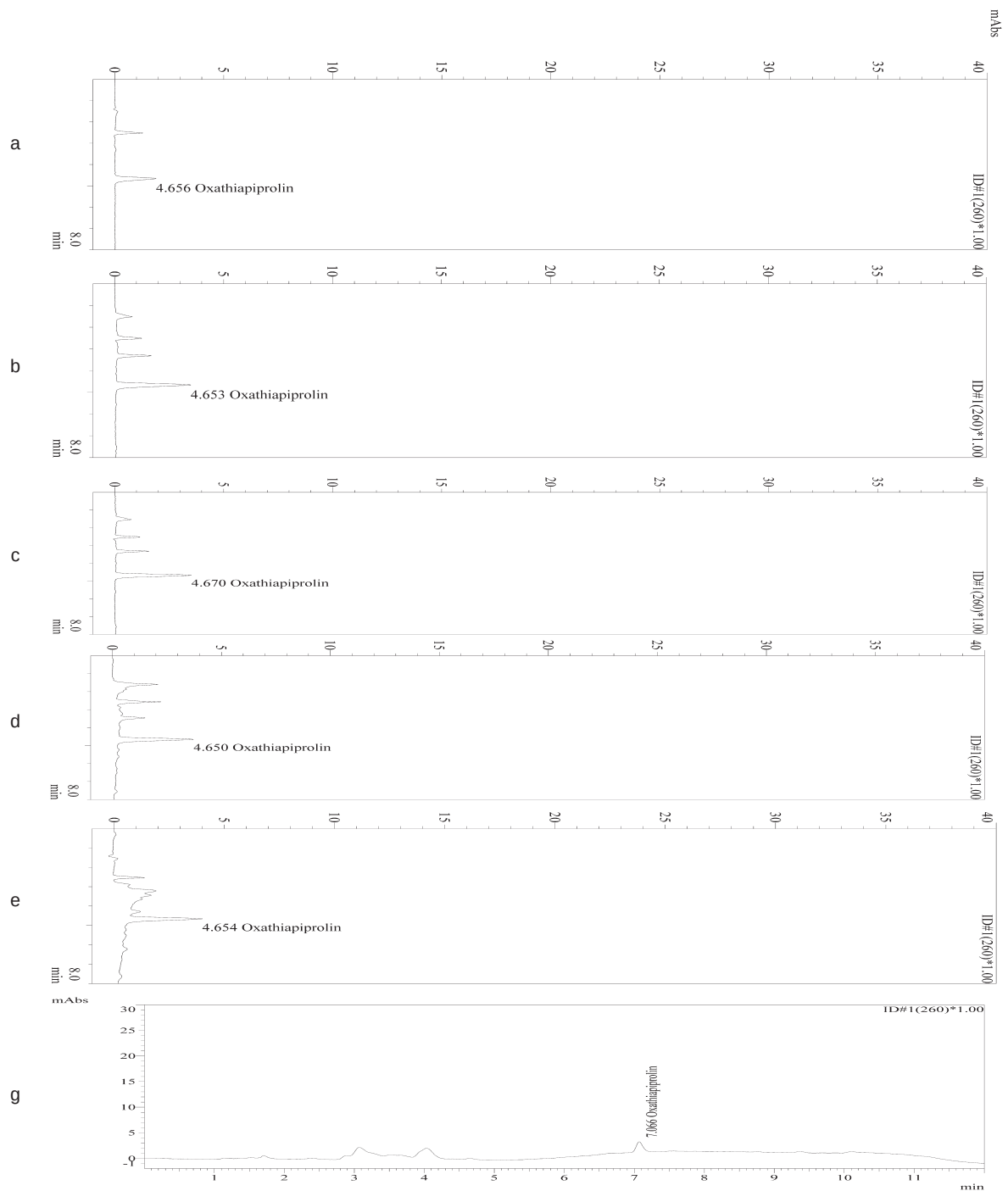


Fig. 2. Chromatograms: a – calibration solutions with oxathiapiprolin concentrations 0.5  $\mu\text{g/ml}$ ; b – working zone air samples with the oxathiapiprolin introduction on level 0.5  $\text{mg/m}^3$ ; c – atmosphere air samples with the oxathiapiprolin introduction on level 0.008  $\text{mg/m}^3$ ; d – water samples with the oxathiapiprolin introduction on level 0.005  $\text{mg/m}^3$ ; e – soil samples with the oxathiapiprolin introduction on level 0.1  $\text{mg/kg}$ ; g – potato samples with the oxathiapiprolin introduction on level 0.01  $\text{mg/kg}$ .

#### LIST OF LITERATURE

- Public release summary on the evaluation of the new active oxathiapiprolin in the product DuPont Zorvec Enicade Fungicide / APVMA Product Number 68375. – 2015. – 54 p.
- Discovery of oxathiapiprolin, a new oomycete fungicide that targets an oxysterol binding protein / R. J. Pasteris, M. A. Hanagan, J. J. Bisaha [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2016. – No. 24(3). – P. 354–361.
- Determination of oxathiapiprolin concentration and dissipation in grapes and soil by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / Yu. Pingzhong, Jia Chunhong, Ercheng Zhao [et al.] //

Journal of the Science of Food and Agriculture. – 2017. – [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.8178/full>.

4. Establishment of an analytical method for determination of fungicide oxathiapiprolin in agricultural commodities using HPLC-UV Detector /Jin Jang, Heejung Kim, Jung Ah Do [et al.] // Journal of Food Hygiene and Safety. – 2016. – **31**. – No.3 – P. 186–193.

5. Оптимізація аналітичного контролю залишкових кількостей діючих речовин гербіциду Майстер Пауер ОД/А. М. Антоненко, В. Г. Бардов, О. М. Коршун [та ін.] // Мед. перспективи. – 2012. – **XVII**, № 2. – С. 78–83.

6. Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis/ Lidia María Ravelo-Pérez,

Javier Hernández-Borges, Miguel Ángel Rodríguez-Delgado // Journal of Separation Science. – 2006. – **29**, Issue 17. – P. 2557–2577.

7. Міжнародний стандарт ISO 0 8466-1:1990 (E). Качество воды – Калибровка и оценка аналитических методов определения рабочих характеристик. Часть 1 : Статистическая обработка линейной калибровочной функции. – 10 с.

8. Про використання норм точності і правильності вимірювань при здійсненні контролю за вмістом хімічних речовин в продовольчій сировині, продуктах харчування і об'єктах довкілля і відповідності між величинами МДР і ГДК і границями аналітичного визначення хімічних речовин : Постанова МОЗ України від 20 квітня 1999 р. № 20.

#### REFERENCES

1. Public release summary on the evaluation of the new active oxathiapiprolin in the product DuPont Zorvec Enicade Fungicide. (2015).

2. Pasteris, R.J., Hanagan, M.A., Bisaha, J.J., Finkelstein, B.L., Hoffman, L.E., Gregory V. ... Berger, R.A. (2016). Discovery of oxathiapiprolin, a new oomycete fungicide that targets an oxysterol binding protein. *Bioorg. Med. Chem.*, 24 (3), 354-361.

3. Pingzhong, Yu., Chunhong, Jia, Ercheng, Zhao, Li, Chen, Hongju, He, Junjie, Jing, Min, He (2017). *Determination of oxathiapiprolin concentration and dissipation in grapes and soil by ultrahigh-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Retrieved May 18, 2017, from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.8178/full>.

4. Jin Jang, Heejung Kim, Jung Ah Do, Ah-Young Ko, Eun Hyang Lee, Yunji Ju ... Gyu-Seek Rhee. (2016). Establishment of an analytical method for determination of fungicide oxathiapiprolin in agricultural commodities using HPLC-UV detector. *Journal of Food Hygiene and Safety*, 31 (3), 186-193.

5. Antonenko, A.M., Bardov, V.H., Korshun, O.M., Karpenko, V.V., Korshun O.M., & Lipavska, A.O. (2012). Optymizatsiia analitychnoho kontroliu zalyshkovykh

kilkostei diiuchykh rehovyn herbitydu Maister Pauer OD [Optimization of analytical control of residual quantities of herbicide active substances Master Power EA]. *Medychni perspektyvy – Medical Prospects, XVII (2)*, 78-83 [in Ukrainian].

6. Ravelo-Pérez, L.M., Hernández-Borges, J., & Rodríguez-Delgado, M.Á. (2006). Pesticides analysis by liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Separation Science*, 29 (17), 2557-2577.

7. Mezhdunarodnyi standart ISO 0 8466-1:1990 (E). Kachestvo vody – Kalibrovka i otsenka analiticheskikh metodov opredeleniya rabochikh kharakteristik. Chast 1: Statisticheskaya obrabotka lineynoy kalibrovochnoy funktsii [Water quality – Calibration and evaluation of analytical methods for determining performance. Part 1: Statistical processing of a linear calibration function] [in Russian].

8. Resolution of the Ministry of Health of Ukraine No. 20 of April 20, 1999 "On the use of norms of accuracy and correctness of measurements when controlling the content of chemicals in food raw materials, foodstuffs and objects of the environment and the correspondence between the values of MDR and MPC and the boundaries of analytical determination of chemical Substances.

**О. О. Новохацька, Д. С. Мілохов, О. П. Вавріневич, С. Т. Омельчук, А. М. Антоненко**  
ІНСТИТУТ ГІГІЄНИ ТА ЕКОЛОГІЇ НАЦІОНАЛЬНОГО МЕДИЧНОГО  
УНІВЕРСИТЕТУ ІМЕНІ О. О. БОГОМОЛЬЦЯ, КИЇВ

## АНАЛІТИЧНЕ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ ГІГІЄНИЧНОГО КОНТРОЛЮ ЗАЛИШКОВИХ КІЛЬКОСТЕЙ ОКСАТІАПІПРОЛІНУ В ОБ'ЄКТАХ НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА ТА КАРТОПЛІ

### Резюме

**Вступ.** Забезпечення аналітичного контролю за використанням пестицидів в об'єктах довкілля та сільськогосподарській продукції – обов'язкова складова передреєстраційних досліджень нових сполук. Найбільше поширення для контролю за застосуванням пестицидів в Україні отримав метод високоефективної рідинної хроматографії.

**Мета дослідження** – розробити аналітичні методи визначення оксатіапіпроліну в повітрі, воді, ґрунті й картоплі для гігієнічного контролю за дотриманням гігієнічних нормативів в об'єктах довкілля та сільськогосподарській сировині.



**Методи дослідження.** Оксатіапіпролін – сполука нового хімічного класу піперидиніл-тіазол-ізоксазолінів. Для дослідження використано метод високоефективної рідинної хроматографії.

**Результати й обговорення.** Було встановлено оптимальні умови хроматографування оксатіапіпроліну: рухома фаза – суміш ацетонітрил+бідистильована вода (75+25), довжина хвилі УФ-детектора – 260 нм, температура термостата колонки – 30 °С. Час утримування за даних умов становив (4,6±0,1) хв. Лінійний діапазон детектування – 0,5–10,0 мкг/мл. Градувальна залежність площі (S) піків досліджуваної речовини від її концентрації (ρ) описана рівнянням лінійної регресії:  $S_{\text{оксатіапіпролін}} = 272,4 + 36315,7 \times \rho$ .

Найкращі результати отримано при концентруванні повітря на паперовий фільтр “синя стрічка” з подальшою екстракцією речовини ацетоном. При виборі екстрагентів для визначення оксатіапіпроліну у воді найкращі результати одержано з етилацетатом, у ґрунті – з ацетоном, у картоплі – із сумішшю ацетонітрил+0,5 % водний розчин ортофосфорної кислоти з подальшим очищенням екстрактів проб ґрунту та картоплі за допомогою адсорбційної хроматографії.

**Висновок.** Розроблені аналітичні методи відповідають сучасним вимогам, є селективними та дозволяють контролювати оксатіапіпролін у воді на рівні межі виявлення – 0,002 мг/дм<sup>3</sup>, у повітрі робочої зони – 0,2 мг/м<sup>3</sup>, в атмосферному повітрі – 0,003 мг/м<sup>3</sup>, у ґрунті – 0,03 мг/кг, у картоплі – 0,003 мг/кг.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: оксатіапіпролін; рідинна хроматографія; повітря; вода; ґрунт; картопля.

О. А. Новохацька, Д. С. Милохов, Е. П. Вавриневич, С. Т. Омельчук, А. Н. Антоненко  
ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ И ЭКОЛОГИИ НАЦИОНАЛЬНОГО МЕДИЦИНСКОГО  
УНИВЕРСИТЕТА ИМЕНИ А. А. БОГОМОЛЬЦА, КИЕВ

## АНАЛИТИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ОСТАТОЧНЫХ КОЛИЧЕСТВ ОКСАТИАПИПРОЛИНА В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И КАРТОФЕЛЕ

### Резюме

**Вступление.** Обеспечение аналитического контроля за использованием пестицидов в объектах окружающей среды и сельскохозяйственной продукции – обязательная составляющая предрегистрационных исследований новых веществ. Наибольшее распространение для контроля за применением пестицидов в Украине получил метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Цель исследования** – разработать аналитические методы определения оксатиапипролина в воздухе, воде, почве и картофеле для гигиенического контроля за соблюдением гигиенических нормативов в объектах окружающей среды и сельскохозяйственном сырье.

**Методы исследования.** Оксатиапипролин – соединение нового химического класса пиперидинил-тиазол-изоксазолинов. Для исследования использовано метод высокоэффективной жидкостной хроматографии.

**Результаты и обсуждение.** Были установлены оптимальные условия хроматографирования оксатиапипролина: подвижная фаза – смесь ацетонитрил+бидистиллированная вода (75+25), длина волны УФ-детектора – 260 нм, температура термостата колонки – 30 °С. Время удерживания в данных условиях составляло (4,6±0,1) мин. Линейный диапазон детектирования – 0,5–10,0 мкг/мл. Градуировочная зависимость площади (S) пиков исследуемого вещества от его концентрации (ρ) описана уравнением линейной регрессии:  $S_{\text{оксатиапипролина}} = 272,4 + 36315,7 \times \rho$ .

Наилучшие результаты получены при концентрировании воздуха на бумажный фильтр “синяя лента” с дальнейшей экстракцией вещества ацетоном. При выборе экстрагентов для определения оксатиапипролина в воде наилучшие результаты получено с этилацетатом, в почве – с ацетоном, в картофеле – со смесью ацетонитрил+0,5 % водный раствор ортофосфорной кислоты с дальнейшим очищением экстрактов проб почвы и картофеля с помощью адсорбционной хроматографии.

**Вывод.** Разработанные аналитические методы соответствуют современным требованиям, являются селективными и позволяют контролировать оксатиапипролин в воде на уровне предела обнаружения – 0,002 мг/дм<sup>3</sup>, в воздухе рабочей зоны – 0,2 мг/м<sup>3</sup>, в атмосферном воздухе – 0,003 мг/м<sup>3</sup>, в почве – 0,03 мг/кг, в картофеле – 0,003 мг/кг.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: оксатиапипролин; жидкостная хроматография; воздух; вода; почва; картофель.

Received 19.06.17

Address for correspondence: O. O. Novohatska, Hygiene and Ecology Institute of O. Bohomolets National Medical University, Myroslavskaya Street, 3, apt. 65, Kyiv, 02232, Ukraine, e-mail: alesya.novohacka@ukr.net.