

**АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ**  
**ANALYTICAL CHEMISTRY**УДК 615.285:542.61:543.544.5.068.7:543.51:638.162  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-2-139-149>Поступила в редакцию 29.11.2022  
Received 29.11.2022**А. Г. Полоневич<sup>1</sup>, С. М. Лещев<sup>2</sup>, О. А. Булгакова<sup>1</sup>, Л. Л. Бельшева<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Научно-практический центр гигиены, Минск, Республика Беларусь  
<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Республика Беларусь**ЭКСТРАКЦИЯ АМИТРАЗА И ЕГО МЕТАБОЛИТОВ  
ОРГАНИЧЕСКИМИ РАСТВОРИТЕЛЯМИ**

**Аннотация.** Оценены константы распределения амитраза и трех его основных метаболитов (ДМФФ, ДМФ, ДМА) для экстракционных систем вода–органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ). Согласно анализу распределения веществ в изученных системах установлено, что дихлорметан является оптимальным экстрагентом для разработки методики одновременного определения амитраза и трех его метаболитов в меде, основанной на жидкость–жидкостной экстракции. На основании изучения стабильности амитраза в водно-ацетонитрильных растворах с различными добавками установлен состав растворителя для итоговых растворов проб – 50 мМ раствор аммиака в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1, об.).

**Ключевые слова:** амитраз, метаболиты амитраза, константы распределения, жидкость–жидкостная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия, мед

**Для цитирования.** Экстракция амитраза и его метаболитов органическими растворителями / А. Г. Полоневич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2023. – Т. 59, № 2. – С. 139–149. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-2-139-149>

**A. G. Polonevich<sup>1</sup>, S. M. Leschev<sup>2</sup>, V. A. Bulhakava<sup>1</sup>, L. L. Belyshava<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Scientific Practical Center of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus  
<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Republic of Belarus**EXTRACTION OF AMITRAZ AND ITS METABOLITES WITH ORGANIC SOLVENTS**

**Abstract.** The distribution constants of amitraz and its three main metabolites (DMFF, DMF, DMA) for water–organic solvent (*n*-hexane, toluene, dichloromethane, chloroform) extraction systems were estimated. Based on the analysis of the substances distribution in the studied systems, it was established that dichloromethane is the optimal choice for amitraz and its metabolites liquid–liquid extraction for method development for their simultaneous determination in honey. Amitraz stability study in water–acetonitrile solutions with various additives demonstrated that 50 mM ammonia solution in water–acetonitrile mixture (1 : 1, vol.) should be used as solvent for the samples final solutions.

**Keywords:** amitraz, amitraz metabolites, distribution constants, liquid–liquid extraction, high-performance liquid chromatography, mass-spectrometry, honey

**For citation.** Polonevich A. G., Leschev S. M., Bulhakava V. A., Belyshava L. L. Extraction of amitraz and its metabolites with organic solvents. *Vesti Natsyonal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnyh navuk = Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. Chemical series*, 2023, vol. 59, no. 1, pp. 139–149 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2023-59-2-139-149>

**Введение.** Амитраз (N<sup>2</sup>-(2,4-диметилфенил)-N-[[2,4-диметилфенил]имино]метил]-N-метилметанимидаид) – формаидиновый инсектицид и акарицид широкого спектра действия – используют в сельском хозяйстве и ветеринарии для контроля эктопаразитов, а также в качестве пестицида. В пчеловодстве данный препарат применяют против паразитических клещей *Varroa*, вызывающих у пчел заболевание варроатоз, что обуславливает возможное присутствие остаточных количеств амитраза и его метаболитов в меде и, как следствие, их дальнейшее попадание в организм человека [1–3]. Острое отравление амитразом могут сопровождать следующие

симптомы: вялость, брадикардия, гипотермия, одышка, низкое кровяное давление, мидриаз, рвота, гиперсаливация, обезвоживание, судороги, гипертензия или гипотензия [1]. Помимо самого амитраза также токсичны продукты его распада и метаболизма [1, 4, 5].

Поскольку амитраз является нестабильным соединением [5–7], в меде регламентируют суммарное содержание остаточных количеств амитраза и его метаболитов. Согласно Гигиенического норматива № 52 [8], ТР ТС 021/2011 [9] и Регламента Комиссии Европейского союза № 37/2010 [10] максимально допустимый уровень суммы остатков амитраза и его метаболитов, содержащих 2,4-диметиланилиновую группу, составляет 200 мкг/кг. Основными метаболитами являются N-(2,4-диметилфенил)-N'-метилимидоформаид (ДМФФ), N-(2,4-диметилфенил)формаид (ДМФ) и 2,4-диметиланилин (ДМА) [1, 5, 6, 11].

Химический состав меда довольно сложен и представлен в основном сахарами, водой, азотистыми веществами, ферментами, органическими кислотами, минеральными веществами, витаминами и другими органическими соединениями [12]. Как следствие, для мониторинга содержания амитраза и его метаболитов в меде необходим чувствительный и селективный метод инструментального определения, каким является метод тандемной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС).

Кроме того, необходима предварительная подготовка проб меда. Существующие подходы к пробоподготовке для определения амитраза можно разделить на две группы. Первая группа методик включает экстракцию амитраза и его метаболитов и их последующий гидролиз до ДМА с возможной дериватизацией [5, 13–16]. Методики данной группы многостадийны и трудоемки в исполнении. Вторая группа методик включает извлечение аналитов и очистку экстрактов для дальнейшего определения каждого вещества по отдельности [2, 3, 5, 11, 14, 17–19]. Часть способов определения амитраза второй группы представляют собой варианты метода QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) [2, 14, 18, 19], являющегося наиболее эффективным и экспрессным лишь при наличии готовых наборов реактивов, другая часть включает очистку экстрактов с использованием готовых картриджей для твердофазной экстракции и для экстракции на твердом носителе [11, 17], которые не всегда доступны. Часть методик второй группы основана на использовании жидкость-жидкостной экстракции без очистки получаемых экстрактов [3, 5]. В [3] в качестве экстрагента используют смесь *n*-гексана и изопропанола для извлечения амитраза и лишь одного метаболита ДМА из меда. В [5] для определения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в пробах персиков используют этилацетат, однако из меда данный растворитель помимо аналитов способен извлекать множество мешающих матричных компонентов. Существующая официальная методика контроля меда [20] основана на использовании метода QuEChERS и предназначена для определения только самого амитраза.

Таким образом, разработка методики одновременного определения амитраза и основных его метаболитов в меде, включающей доступную для рутинных исследований, нетрудоемкую пробоподготовку, является актуальной задачей. Для ее выполнения наиболее рационально использовать удобную, простую в реализации жидкость-жидкостную экстракцию. Данный подход ранее применили для определения амитраза в меде с экстрагентом *n*-гексаном [21], не способным достаточно эффективно извлекать метаболиты. Для выбора оптимального экстрагента амитраза и трех его основных метаболитов ДМФФ, ДМФ и ДМА необходимо изучить закономерности их распределения в системах вода–органический растворитель. Необходимо установить также оптимальный состав итоговых растворов проб для обеспечения большей стабильности в них амитраза.

Цель работы – оценить константы распределения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА между водой и некоторыми органическими растворителями и установить состав итоговых растворов проб, обеспечивающий приемлемую стабильность амитраза, для последующей разработки методики определения амитраза и трех его метаболитов в меде с использованием жидкость-жидкостной экстракции и метода ВЭЖХ–МС/МС.

**Материалы и методы.** В качестве стандартных образцов использовали амитраз массовой долей 99,8 % (Sigma-Aldrich, США); ДМФФ – 100,0 % (British Pharmacopoeia Commission Laboratory, Великобритания), ДМФ – 99,9 % и ДМА массовой долей 99,4 % (Sigma-Aldrich, США). Структурные формулы амитраза и его метаболитов представлены на рис. 1.

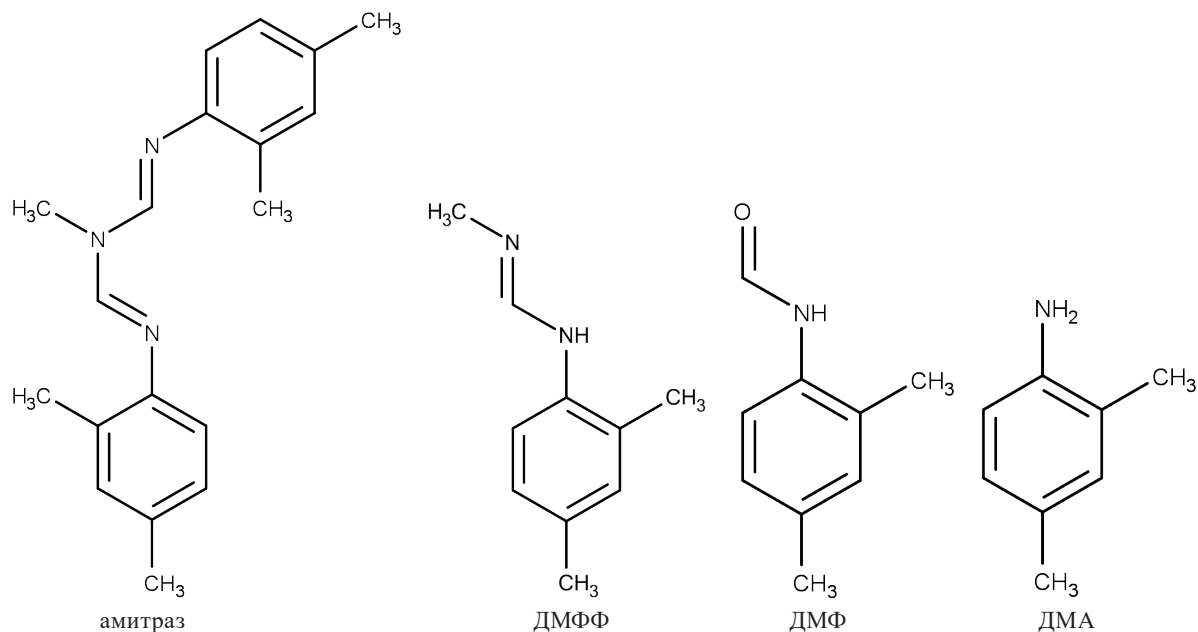


Рис. 1. Структурные формулы амитраза и его метаболитов

Fig. 1. Structural formula of amitraz and its metabolites

Применяли н-гексан для ВЭЖХ ( $\geq 96\%$ , Carlo Erba, Франция); ацетонитрил для ВЭЖХ ( $\geq 99,9\%$ , Carlo Erba, Франция), дихлорметан для ВЭЖХ ( $\geq 99,9\%$ , Carlo Erba, Франция), хлороформ (База № 1 Химреактивов, Россия), толуол для ВЭЖХ ( $\geq 99,8\%$ , Thermo Scientific, Великобритания), муравьиную кислоту (98%, Acros Organics, Бельгия), аммиак водный ч. д. а. (База № 1 Химреактивов, Россия), формиат аммония (99%, Acros Organics, Испания), гидрокарбонат аммония (99%, Fisher Chemical, Великобритания). Деионизованную воду получали с помощью системы очистки воды Easy pure II RF/UV (Thermo Scientific, США).

Использовали весы аналитические AS 220/C/2/N (Radwag Wagi Elektroniczne, Польша), электровстряхиватель Multi Reax (Heidolph, Германия), центрифугу охлаждаемую Sigma 3-18K (Sigma Laborzentrifugen, Германия), систему упаривания растворителей Turbo Var (Biotage, Великобритания), шприцевые фильтры из регенерированной целлюлозы с размером пор 0,2 мкм диаметром 15 мм (Agilent Technologies, Германия).

Количественное определение амитраза и его метаболитов проводили методом ВЭЖХ–МС/МС с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1200 с масс-спектрометрическим детектором Agilent 6410 (Agilent Technologies, Германия). В качестве неподвижной фазы использовали обращеннофазную колонку Zorbax SB C18 длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, с размером частиц 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). Компоненты подвижной фазы: 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 8 : 2 (В). Режим градиентного элюирования: от 0 до 0,7 мин – 10 об.% В, от 0,7 до 2,7 мин – от 10 до 95 об.% В, от 2,7 до 10,0 мин – 95 об. % В, от 10,0 до 10,1 мин – от 95 до 10 об.% В, от 10,1 до 23,0 мин – 10 об.% В. Скорость потока подвижной фазы – 0,3 мл/мин; температура термостата колонки – 40 °С; объем ввода пробы – 5 мкл. Параметры масс-спектрометрического определения: ионизация электрораспылением в режиме регистрации положительно заряженных ионов, напряжение на капилляре – 4000 В, температура газа десольватации – 350 °С, расход газа для десольватации – 560 дм<sup>3</sup>/ч, давление на распылителе – 45 psi (310 кПа). Параметры воздействия на ионы амитраза, его метаболитов и амитраза-D<sub>3</sub> в режиме мониторинга множественных реакций MRM (значения отношения *m/z* родительских и дочерних ионов, соответствующие значения энергии соударений) представлены в табл. 1.

Количественное определение каждого соединения проводили по одному, наиболее интенсивному MRM переходу, для подтверждения идентификации использовали один либо два менее интенсивных перехода.

Т а б л и ц а 1. Параметры воздействия на ионы амитраза и его метаболитов в режиме MRM

Table 1. Parameters of exposure on amitraz and its metabolites ions in the MRM mode

Наименование вещества	$m/z$ родительского иона	$m/z$ дочернего иона	Энергия соударений, В
Амитраз	294	163	13
	294	122	34
	294	107	50
ДМФФ	163	122	18
	163	107	26
ДМФ	150	132	13
	150	107	23
	150	77	46
ДМА	122	107	18
	122	79	26
	122	77	30

На рис. 2 приведена хроматограмма, полученная для раствора амитраза и его метаболитов. Для обеспечения приемлемого хроматографического разделения всех исследуемых веществ градиентное элюирование начали с соотношения водного (А) и органического (В) компонентов подвижной фазы равного 9 : 1. Однако установили, что разбавление ацетонитрильного раствора амитраза, полученного растворением сухого остатка упаренного экстракта амитраза из меда, водной фазой до содержания воды 90 % приводило к значительным потерям инсектицида. Аналогичное разбавление чистых ацетонитрильных растворов амитраза водой уменьшения сигнала вещества не вызывало. В результате установили, что разбавление сухих остатков упаренных экстрактов в ацетонитриле и воде в соотношении 1 : 1 позволяет избежать описанных затруднений.

С целью выбора оптимального состава итоговых растворов проб изучили кратковременную стабильность водно-ацетонитрильных растворов амитраза концентрациями 100 нг/мл при температуре (4–6) °С, находящихся в автосамплере. В качестве растворителей использовали 50 мМ

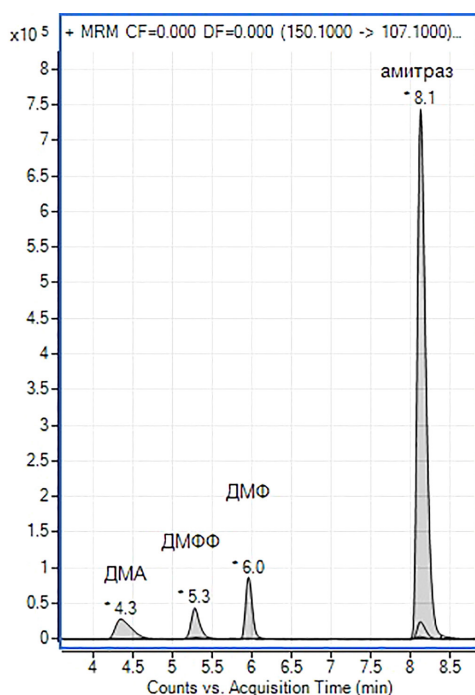


Рис. 2. Хроматограмма раствора амитраза и его метаболитов

Fig. 2. Chromatogram of amitraz solution and its metabolites

раствор муравьиной кислоты в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1), смесь вода–ацетонитрил (1 : 1) без добавок, 50 мМ раствор формиата аммония в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1), 50 мМ раствор гидрокарбоната аммония в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1) и 50 мМ раствор аммиака в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1). Приготовленные растворы периодически анализировали методом ВЭЖХ–МС/МС в течение 14–23 ч. Концентрацию амитраза и его метаболитов рассчитывали по градуировочным растворам, приготовленным в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1) и проанализированный непосредственно перед началом исследования.

Константы распределения амитраза и его метаболитов определяли при температуре  $20 \pm 1$  °С. В качестве органических экстрагентов применяли *n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ. Объектами исследования являлись растворы метаболитов амитраза концентрациями 100 нг/мл в 100 мМ водном растворе аммиака при pH 10,9. Соответствующие молярные концентрации распределяемых веществ были достаточно низкими (от 0,62 до 0,83 мкМ/л), следовательно, коэффициенты активности веществ близки к единице. Согласно значениям констант кислотной диссоциации ( $pK_{a1} = 8,34$ ,  $pK_{a2} = 8,96$  для амитраза,  $pK_a = 8,81$  для ДМФФ,  $pK_a = 16,13$  для ДМФ и  $pK_a = 4,88$  для ДМА (рассчитаны в программе MarvinSketch, версия

18.16.0, год выпуска 2018)) при pH 10,9 мольные доли молекулярных форм аналитов составляли не менее 99 %. Растворы готовили непосредственно перед началом эксперимента. Величины отношения объемов водной и органической фаз  $r$  варьировали в диапазоне от 1 до 40. Величины концентраций определяли с использованием градуировочных растворов. Значения констант распределения определяли по убыли аналитов из водной фазы:

$$P = \frac{[B]_{\text{орг}}}{[B]_{\text{вод}}} = \frac{(C_0 - [B]_{\text{вод}}) \frac{V_{\text{вод}}}{V_{\text{орг}}}}{[B]_{\text{вод}}}, \quad (1)$$

где  $[B]_{\text{орг}}$  – равновесная концентрация вещества в органической фазе, нг/мл;  $[B]_{\text{вод}}$  – равновесная концентрация вещества в водной фазе, нг/мл;  $C_0$  – концентрация вещества в исходном водном растворе, нг/мл;  $V_{\text{вод}}$  – равновесный объем водной фазы, мл;  $V_{\text{орг}}$  – равновесный объем органической фазы, мл.

Так как константы распределения амитраза превышают 1000, прямое оценивание их величин не представляется возможным. Поэтому для амитраза оценили только величину константы распределения в системе вода–*n*-гексан на основании значений растворимости в данных растворителях. Растворимость в *n*-гексане определяли гравиметрически: для этого готовили насыщенный раствор амитраза в *n*-гексане, затем переносили аликвоту полученного раствора в предварительно взвешенную чистую виалу, испаряли растворитель и взвешивали виалу с инсектицидом. Для определения растворимости амитраза в воде в центрифужной пробирке готовили раствор с условной концентрацией вещества, равной 1 мг/мл в 50 мМ раствора аммиака в воде. Добавку аммиака использовали для обеспечения нахождения амитраза в непротонированной форме. Раствор перемешивали на вихревой мешалке 30 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 10000 об/мин и 20 °С. Отбирали аликвоту супернатанта для последующего разбавления и количественного определения концентрации амитраза в разбавленном растворе и расчета растворимости вещества в воде.

Для систем вода–органический растворитель предсказывали возможную степень экстракции  $Rec$  молекулярных форм аналитов при различном соотношении фаз согласно формуле

$$Rec = \frac{P}{P + r}, \quad (2)$$

где  $r$  – отношение равновесных объемов водной и органической фаз.

**Результаты и их обсуждение.** На рис. 3 представлены графики изменения концентрации амитраза в водно-ацетонитрильных растворах при их кратковременном хранении при температуре (4–6) °С.

Согласно рис. 3 растворы, содержащие муравьиную кислоту, наименее стабильны: в кислой среде содержание амитраза упало на 40 % менее чем за 1,5 ч, на 90 % – за ~ 8 ч, а через 22 ч осталось менее 1 % исходного количества. Далее по стабильности следуют растворы амитраза с добавками формиата аммония и гидрокарбоната аммония: за 13 ч содержание амитраза в них не опустилось менее 80 и 83 % соответственно. Наиболее устойчивым амитраз был в растворе, не содержащем добавок, а также в основном растворе с добавкой аммиака: в данных модельных растворах количество амитраза изменялось не монотонно и не опустилось ниже, чем на 10 % относительно исходного состояния.

Зафиксировали в какие из основных метаболитов превращается амитраз с течением времени. На рис. 4 изображены графики изменения содержания амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в растворах, содержащих муравьиную кислоту, формиат аммония и гидрокарбонат аммония.

В растворах с добавкой муравьиной кислоты из амитраза образовывались ДМФФ и ДМФ примерно в равных количествах, со временем увеличивалось содержание ДМА, однако его концентрация была небольшой и не превысила 5 нг/мл. В растворах с добавками формиата аммония и гидрокарбоната аммония основным продуктом деструкции являлся ДМФФ, также ДМФ и ДМА в незначительных количествах. Суммарная массовая концентрация амитраза и его метаболитов не всегда соответствовала исходной массовой концентрации. В частности, заметная



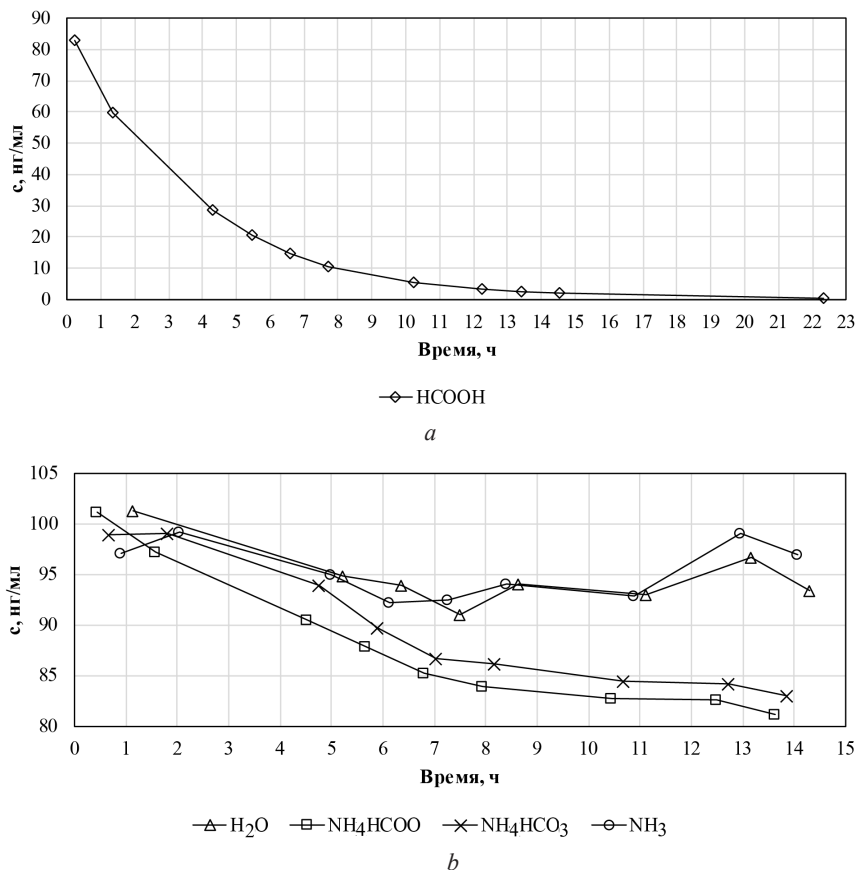


Рис. 3. Изменение концентрации амитраза во времени в водно-ацетонитрильных растворах: (а) с добавкой муравьиной кислоты, (б) без добавок, с добавками формиата аммония, гидрокарбоната аммония и аммиака  
 Fig. 3. Concentration change of amitraz over time in aqueous-acetonitrile solutions: (a) with the addition of formic acid, (b) without additives, with the addition of ammonium formate, ammonium bicarbonate and ammonia

разница зафиксирована для растворов, содержащих муравьиную кислоту: превышение суммарной массы веществ относительно ожидаемого количества достигала 30 %. Для других растворов разность между ожидаемым и рассчитанным количеством не превышала 8 %. Одной из причин данных отличий мог выступать дрейф аналитического сигнала амитраза, что может быть нивелировано использованием дейтерированного амитраза в качестве внутреннего стандарта.

Таким образом, стабильность амитраза в растворах с добавками увеличивалась с ростом pH. Стабильность в растворе без добавок оказалась сопоставимой с раствором, содержащим аммиак. Поскольку pH водных растворов сухих остатков упаренных экстрактов амитраза и его метаболитов, полученных после его извлечения из меда, составляла менее 6, для обеспечения большей стабильности аналитов сухой остаток следует растворять в 50 мМ растворе аммиака в водно-ацетонитрильной смеси (1 : 1). Также добавка аммиака способствовала лучшему удерживанию сорбентом хроматографической колонки легко протонируемого в подвижной фазе ДМА (константа диссоциации  $pK_a = 4,88$ ).

Оцененные значения логарифмов констант распределения ( $n = 3$ , величины относительного стандартного отклонения не превышали 10 %) в экстракционных системах вода–органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ) представлены в табл. 2. Значения отношения объемов фаз  $V$ , необходимое для извлечения из водной фазы 95 % аналитов изученными растворителями, приведены в табл. 3.

Последовательность изученных растворителей в порядке увеличения их экстрагирующей способности следующая: *n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ. Наибольшую скорость роста величин  $P$  с увеличением экстракционной способности растворителей наблюдали для самого полярного изученного соединения – ДМФ.

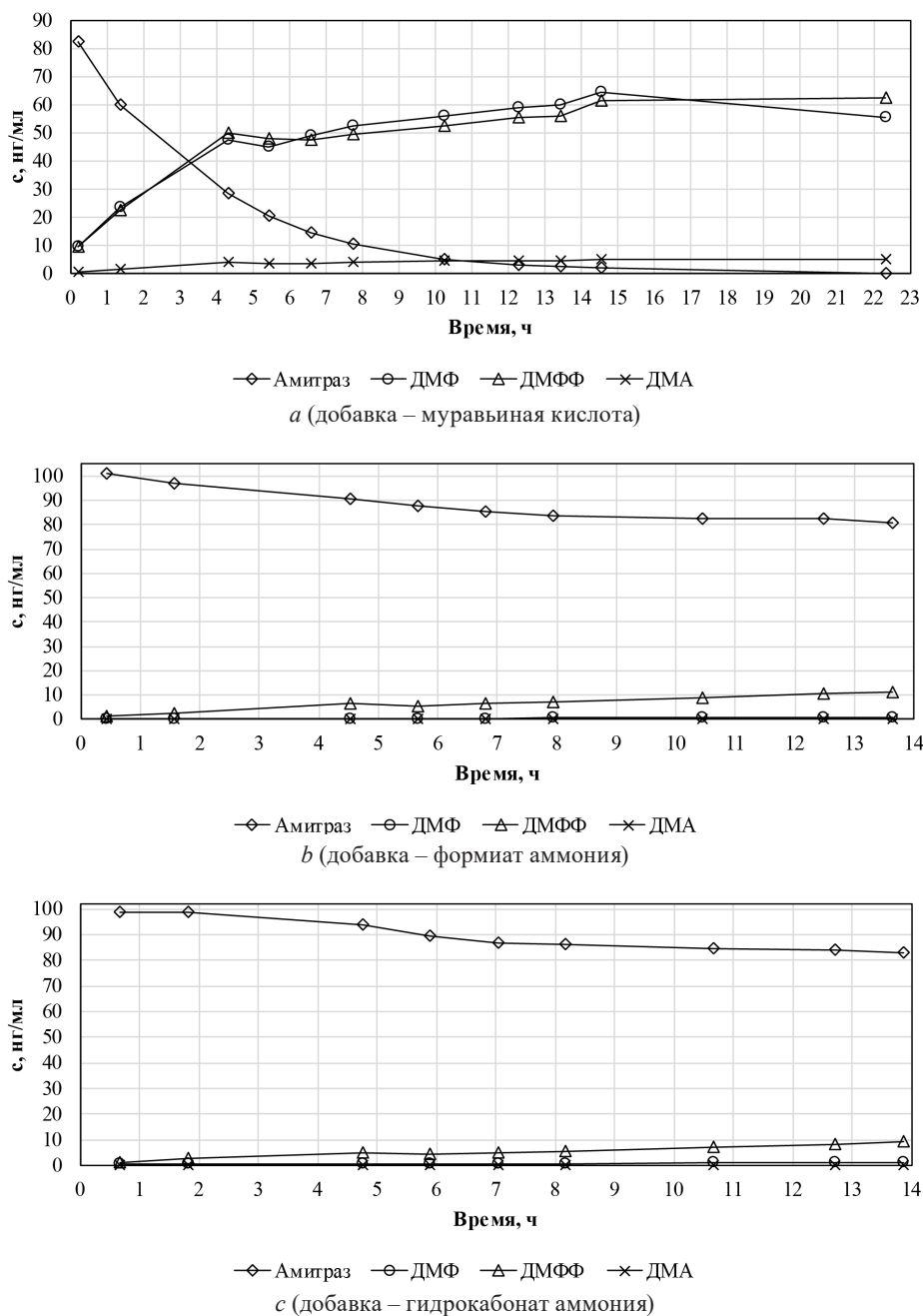


Рис. 4. Изменение концентрации амитраза и его метаболитов с течением времени в водно-ацетонитрильных растворах: *a* – с добавкой муравьиной кислоты; *b* – с добавкой формиата аммония; *c* – с добавкой гидрокарбоната аммония

Fig. 4. Concentration change of amitraz and its metabolites over time in aqueous-acetonitrile solutions: *a* – with formic acid addition; *b* – with ammonium formate addition; *c* – with ammonium bicarbonate addition

Константа распределения амитраза в экстракционной системе водная фаза–*n*-гексан рассчитана на основании экспериментально оцененных значений растворимости амитраза в *n*-гексане и воде, которые составили  $3,0 \cdot 10^4$  и 0,24 мг/мл соответственно. Полученное значение растворимости амитраза в воде не противоречит опубликованным данным: 0,1 мг/мл при 20 °С [22], 1 мг/мл при комнатной температуре [23], 2,9 мг/мл (экспериментальная оценка) и 1,0 мг/мл (рассчитанная) [24]. Таким образом, константа распределения амитраза в системе водная фаза–*n*-гексан составила  $1,25 \cdot 10^5$  ( $\lg P = 5,1$ ). Порядок полученной оценки согласуется с литературными данными: рассчитанные значения логарифма константы распределения для системы *n*-октанол–вода составляет 5,5 [22, 25] и 5,8 (MarvinSketch, версия 18.16.0).

Т а б л и ц а 2. Логарифмы констант распределения амитраза и его метаболитов в экстракционных системах вода–органический растворитель

T a b l e 2. Distribution constants logarithms of amitraz and its metabolites in water–organic solvent extraction systems

Вещество	lgP			
	растворитель			
	<i>n</i> -гексан	толуол	дихлорметан	хлороформ
Амитраз	5,1	–	–	–
ДМФФ	0,94	2,0	2,4	2,5
ДМФ	–0,36	1,0	1,7	1,9
ДМА	1,0	1,8	2,2	2,3

Т а б л и ц а 3. Значения отношения объемов фаз *r* для извлечения из водной фазы 95 % аналитовT a b l e 3. Values of phase volume ratio *r* for 95 % of the analytes extraction from the aqueous phase

Вещество	<i>r</i>			
	растворитель			
	<i>n</i> -гексан	толуол	дихлорметан	хлороформ
Амитраз	$7 \cdot 10^3$	–	–	–
ДМФФ	0,5	5	13	16
ДМФ	0,02	0,6	3	4
ДМА	0,6	4	9	10

Значения констант распределения амитраза и его метаболитов для систем водная фаза–*n*-гексан увеличиваются в следующем порядке: ДМФ < ДМФФ < ДМА < амитраз. Для извлечения неполярного, хорошо поляризуемого амитраза, *n*-гексан является не только чрезвычайно эффективным, но и наиболее селективным экстрагентом. Для количественного выделения амитраза из его водных растворов достаточно однократной экстракции даже при высокой величине отношения (3–4 порядка) объема водной фазы к объему *n*-гексана. Таким образом, извлечение амитраза *n*-гексаном из меда позволяет многократно концентрировать аналит, отделять компоненты матрицы и не требует дополнительной очистки экстрактов. Реализация данного подхода описана ранее [21].

Неполярный, способный лишь на неспецифические ван-дер-ваальсовы взаимодействия *n*-гексан недостаточно интенсивно извлекает метаболиты инсектицида. Однако можно достичь 95 %-ного извлечения ДМА и ДМФФ за одну стадию при превышении объема *n*-гексана над объемом водной фазы приблизительно в 2 раза. В то же время на стадии упаривания гексанового экстракта в токе азота периодически происходят значительные потери ДМА, что, возможно, обусловлено его летучестью. Полярный метаболит ДМФ *n*-гексаном количественно извлечь невозможно: константа распределения составила 0,4. Как было отмечено ранее, величины констант распределения амитраза для толуола, дихлорметана и хлороформа не оценивали, поскольку их ожидаемые значения высоки и намного превышают полученную оценку для *n*-гексана.

Следующим по эффективности после *n*-гексана следует толуол, ароматические молекулы которого способны к взаимодействиям с  $\pi$ -электронными участками молекул аналитов. Оценки констант распределения метаболитов в системах водная фаза–толуол располагаются в порядке ДМФ < ДМА < ДМФФ. Соотношение величин констант распределения ДМА и ДМФФ изменилось относительно экстракционных систем с участием *n*-гексана, что может быть объяснено незначительным кислотно-основным взаимодействием протонов толуола с атомом азота ДМФФ, не сопряженным с бензольным кольцом. Таким образом, принципиально толуол мог быть использован как экстрагент амитраза и его метаболитов, в том числе и для ДМФ ( $\lg P = 0,6$ ), но для концентрирования упариванием толуольных экстрактов необходима достаточно высокая температура нагрева, что крайне нежелательно из-за нестабильности амитраза, а также летучести ДМА.



Самые высокие значения констант распределения получили для экстракционных систем водная фаза–дихлорметан и хлороформ, порядок изменения их величин для аналитов сохранился таким же, как и для толуола: ДМФ < ДМА < ДМФФ. Большое сродство метаболитов к дихлорметану и хлороформу относительно *n*-гексана и толуола может быть обусловлено взаимодействием электронодонорных групп (атомов азота во всех метаболитах и кислорода в ДМФ) с «кислыми» атомами водорода данных растворителей.

Согласно полученным оценкам *P*, хлороформ и дихлорметан могут быть успешно использованы для извлечения амитраза и трех его метаболитов из водных растворов меда. Также данные растворители не извлекают из меда сахара, минеральные вещества и некоторые другие матричные компоненты, что позволит получать достаточно чистые экстракты, не требующие дополнительной очистки. С учетом того что температура кипения дихлорметана ниже чем у хлороформа, дихлорметан является более оптимальным экстрагентом, поскольку удаление органического растворителя может быть осуществлено при более низкой температуре.

**Заключение.** На основании изучения стабильности амитраза в водно-ацетонитрильных растворах с различными добавками установлен состав растворителя для итоговых растворов проб – 50 мМ раствор аммиака в смеси вода–ацетонитрил (1 : 1). Оценены константы распределения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА для экстракционных систем вода–органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ). Сделан вывод, что дихлорметан является оптимальным экстрагентом амитраза и трех его основных метаболитов для разработки методики определения данных контаминантов в меде, основанной на применении жидкость-жидкостной экстракции, не требующей дополнительных стадий очистки экстрактов.

#### Список использованных источников

1. Chapter 41 - Amitraz // *Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles* / ed. R. C. Gupta. – 3d ed. – Academic Press, 2018. – P. 525–531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00041-6>
2. Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly / W. Zheng [et al.] // *J. Chromatogr. B.* – 2018. – Vol. 1072. – P. 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>
3. Determination of amitraz and 2,4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS / J.-Z. Xu [et al.] // *J. Sep. Science.* – 2009. – Vol. 32, iss. 23–24. – P. 4020–4024. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900437>
4. Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos / O. Osano [et al.] // *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* – 2002. – Vol. 43. – P. 42–49. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1132-4>
5. Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / N. Tokman [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2009. – Vol. 1216, iss. 15. – P. 3138–3146. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.099>
6. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS / E. Corta [et al.] // *Talanta.* – 1999. – Vol. 48, iss. 1. – P. 189–199. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00237-9)
7. Solvent and surfactant enhanced solubilization, stabilization, and degradation of amitraz / C. M. van Eeden [et al.] // *J. Environ. Sci. Health, Part B.* – 2004. – Vol. B39, N 1. – P. 33–51. <https://doi.org/10.1081/PFC-120027437>
8. Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов : ГН от 21.06.2013 № 52 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 21.06.2013 № 52 // Сборник нормативных документов по продовольственному сырью и пищевым продуктам. – Минск, 2014. – С. 235.
9. О безопасности пищевой продукции : ТР ТС 021/2011 : принят 09.12.2011 : вступ. в силу 01.07.2013 / Совет Евраз. эконом. комиссии. – Минск : Энергопресс, 2021. – 144 с.
10. Commission Regulation (EU) № 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin // *Off. J. of the European Union.* – 2010. – N L15. – P. 1–72. [https://doi.org/10.3000/17252555.L\\_2010.015.eng](https://doi.org/10.3000/17252555.L_2010.015.eng)
11. Gao, X. Simultaneous determination of amitraz, chlordimeform, formetanate and their main metabolites in human urine by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry / X. Gao, Y. Tan, H. Guo // *J. Chromatogr. B.* – 2017. – Vol. 1052 – P. 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.004>
12. Honey: Chemical composition, stability and authenticity / P. M. da Silva [et al.] // *Food Chem.* – 2016. – Vol. 196. – P. 309–323. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
13. Development and validation of a method for the analysis of total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography–mass spectrometry / M. Caldow [et al.] // *Food Addit. Contam.* – 2007. – Vol. 24, iss. 3. – P. 280–284. <https://doi.org/10.1080/02652030601013638>
14. Analysis of “Amitraz (sum)” in pears with incurred residues – Comparison of the approach covering the individual metabolites via LC–MS/MS with the approach involving cleavage to 2,4-dimethylaniline / J. Hepperle [et al.] // *Food Chem.* – 2015. – Vol. 166. – P. 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.003>

15. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite residue in food animal tissues by gas chromatography–electron capture detector and gas chromatography–mass spectrometry with accelerated solvent extraction / H. Yu [et al.] // *Journal of Chromatography B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2010. – Vol. 878, iss. 21. – P. 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.034>
16. Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection / J. J. Jiménez [et al.] // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – Vol. 524, iss. 1–2. – P. 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.039>
17. Determination of amitraz and its metabolites in whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry / H. Guo [et al.] // *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* – 2014. – Vol. 951–952. – P. 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.027>
18. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS / Y. Ohba [et al.] // *Food Addit. Contam.: Part A Chem. Anal. Control Expo. Risk Assess.* – 2018. – Vol. 35, iss. 12. – P. 2375–2386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539252>
19. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – Honeybee poisoning incidents / T. Kiljanek [et al.] // *J. Chromatogr. A.* – 2016. – Vol. 1435. – P. 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.045>
20. Мёд натуральный. Определение массовой доли инсектицидов методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием : ГОСТ 34889-2022. – Введ. 31.08.2022. – Минск : Евраз. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2022. – 11 с.
21. Разработка и валидация методики определения амитраза в меде высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием / А. Г. Полоневич [и др.] // *Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. хім. навук.* – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 387–397. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-387-397>
22. Amitraz (Ref: ENT 27967) [Electronic resource] // PPDB: Pesticide Properties DataBase. – Mode of access: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/30.htm>. – Date of access: 30.12.2022.
23. Solubilities of pesticide chemicals in water. Part II: Data compilation / Shiu W. Y. [et al.] // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* / eds.: G.W. Ware, H.N. Niggs, A. Bevenue. Springer, New York, 1990. – Vol. 116. – P. 15–187. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3434-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3434-0_2)
24. New QSPR study for the prediction of aqueous solubility of drug-like compounds / P. R. Duchowicz [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 16, iss. 17. – P. 7944–7955. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.067>
25. Amitraz [Electronic resource] // PubChem. – Mode of access: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amitraz>. – Date of access: 30.12.2022.

## References

1. Gupta R. C. (ed.). *Amitraz. Veterinary Toxicology. Basic and Clinical Principles*. 3d ed. Academic Press, 2018. pp. 525–531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811410-0.00041-6>
2. Weijia Zheng, Jin-A. Park, A. M. Abd El-Aty, Seong-Kwan Kim, Sang-Hyun Cho, Jeong-min Choi, Hee Yi, Soo-Min Cho, Amer Ramadan, Ji Hoon Jeong, Jae-Han Shim, Ho-Chul Shin. Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC–MS/MS for simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluralinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 2018, vol. 1072, pp. 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>
3. Jin-Zhong Xu, Jian-Jun Miao, Hong Lin, Tao Ding, Zhen-Yun Zhao, Bin Wu, Chong-Yu Shen, Yuan Jiang. Determination of amitraz and 2,4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS. *Journal of Separation Science*, 2009, vol. 32, iss. 23–24, pp. 4020–4024. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900437>
4. Osano O., Oladimeji A. A., Kraak M. H., Admiraal W. Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 2002, vol. 43, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1132-4>
5. Nilgun Tokman, Carla Soler, Marinel la Farré, Yolanda Picó, Damià Barceló. Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, iss. 15., pp. 3138–3146. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2009.01.099>
6. Corta E., Bakkali A., Berrueta L. A., Gallo B., Vicente F. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS. *Talanta*, 1999, vol. 48, iss. 1, pp. 189–199. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00237-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00237-9)
7. Charmaine M. van Eeden, Wilna Liebenberg, Jan L. du Preez, Melgardt M. de Villiers. Solvent and surfactant enhanced solubilization, stabilization, and degradation of amitraz. *Journal of environmental science and health*, 2004, vol. B39, no 1, pp. 33–51. <https://doi.org/10.1081/PFC-120027437>
8. Indicators of safety and harmlessness for humans of food raw materials and food products: GN 06/21/2013 No. 52: approved. Ministry of Health Republic of Belarus 06/21/2013 No. 52. *Collection of normative documents on food raw materials and food products*. Minsk, 2014. 235 p. (in Russian).
9. Council of the Eurasian Economic Commission. TR TS [Customs Union Technical Regulation] 021/2011. *On the Safety of Food Products*. Minsk, Energopress Publ., 2021. 144 p. (in Russian).
10. Commission Regulation (EU) № 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union*, 2010, no. L15, pp. 1–72. [https://doi.org/10.3000/17252555.L\\_2010.015.eng](https://doi.org/10.3000/17252555.L_2010.015.eng)

11. Gao X., Tan Y., Guo H. Simultaneous determination of amitraz, chlordimeform, formetanate and their main metabolites in human urine by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2017, vol. 1052, pp. 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.03.004>
12. da Silva P. M., Gauche C., Gonzaga L. V., Oliveira Costa A. C., Fett R. Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 2016, vol. 196, pp. 309–323. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>
13. Caldwell M., Fussell R. J., Smith F., Sharman M. Development and validation of a method for the analysis of total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants*, 2007, vol. 24, iss. 3, pp. 280–284. <https://doi.org/10.1080/02652030601013638>
14. Hepperle J., Mack D., Sigalov I., Schüller, S., Anastassiades, M. Analysis of “Amitraz (sum)” in pears with incurred residues – Comparison of the approach covering the individual metabolites via LC–MS/MS with the approach involving cleavage to 2,4-dimethylaniline. *Food Chemistry*, 2015, vol. 166, pp. 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.003>
15. Yu H., Tao Y., Le T., Chen D., Ishsan A., Liu Y., Wang, Y., Yuan, Z. Simultaneous determination of amitraz and its metabolite residue in food animal tissues by gas chromatography-electron capture detector and gas chromatography–mass spectrometry with accelerated solvent extraction. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2010, vol. 878, iss. 21, pp. 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.034>
16. Jiménez J. J., Bernal J. L., del Nozal M. J., Alonso C. Extraction and clean-up methods for the determination of amitraz total residues in beeswax by gas chromatography with electron capture detection. *Analytica Chimica Acta*, 2004, vol. 524, iss. 1–2, pp. 271–278. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.03.039>
17. Guo H., Zhang P., Wang J., Zheng J. Determination of amitraz and its metabolites in whole blood using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 2014, vol. 951–952, pp. 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.01.027>
18. Ohba Y., Nakajima T., Kanda M., Hayashi H., Matsushima Y., Nakagawa Y., Koike H., Nagano C., Sekimura K., Otsuka K., Sasamoto T., Hashimoto T. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 2018, vol. 35, iss. 12, pp. 2375–2386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539252>
19. Kiljanek T., Niewiadomska A., Semeniuk S., Gawel M., Borzęcka M., Posylniak A. Multi-residue method for the determination of pesticides and pesticide metabolites in honeybees by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry – Honeybee poisoning incidents. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1435, pp. 100–114. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.045>
20. State Standard 34889-2022. *Natural Honey. Determination of insecticides by gas chromatography/mass spectrometry*. Minsk, Euro-Asian Council for Standardization, Metrology and Certification, 2022. 11 p. (in Russian).
21. Polonevich A. G., Leschev S. M., Bulhakava V. A., Belyshava L. L. Development and validation of the method for determination of amitraz in honey using high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Vesti Natsyynal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Chemical series*, 2022, vol. 58, no. 4, pp. 387–397 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-387-397>
22. Amitraz (Ref: ENT 27967). *PPDB: Pesticide Properties DataBase*. Available at: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/30.htm>
23. Shiu W. Y., Ma K. C., Mackay D., Seiber J. N., Wauchope R. D. Solubilities of pesticide chemicals in water. Part II: Data compilation. Ware G. W., Niggs H. N., Bevenue A. (eds). *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 116. Springer, New York, 1990, pp. 15–187. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3434-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3434-0_2)
24. Duchowicz R., Talevi A., Bruno-Blanch L. E., Castro E. A. New QSPR study for the prediction of aqueous solubility of drug-like compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, vol. 16, iss. 17, pp. 7944–7955. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2008.07.067>
25. Amitraz. *PubChem*. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amitraz>

### Інфармацыя аб аўтарах

Полоневіч Анна Геннадзьеўна – соискатель кафедры аналитической химии. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь); ведущий химик. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [gannapalanevich@gmail.com](mailto:gannapalanevich@gmail.com)

Лецев Сергей Михайлович – д-р хим. наук, профессор. Белорусский государственный университет (ул. Ленинградская, 14, 220030, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [leschev.sergey54@gmail.com](mailto:leschev.sergey54@gmail.com)

Булгакова Ольга Анатольевна – химик. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [mjuse@rambler.ru](mailto:mjuse@rambler.ru)

Бельшева Людмила Леонидовна – зав. лаб. Научно-практический центр гигиены (ул. Академическая, 8, 220012, Минск, Республика Беларусь). E-mail: [lbelysheva@gmail.com](mailto:lbelysheva@gmail.com)

### Information about the authors

Anna G. Polonevich – doctoral student at the Department of Analytical Chemistry. Belarusian State University (14, Leningradskaya Str., 220030). Leading Chemist. Scientific Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [gannapalanevich@gmail.com](mailto:gannapalanevich@gmail.com)

Sergey M. Leschev – Ph. D. (Chemistry), Professor. Belarusian State University. (14, Leningradskaya Str., 220030). E-mail: [leschev.sergey54@gmail.com](mailto:leschev.sergey54@gmail.com)

Volha A. Bulhakava – chemist. Scientific Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [mjuse@rambler.ru](mailto:mjuse@rambler.ru)

Liudmila L. Belysheva – Head of the Laboratory. Scientific Practical Center of Hygiene (8, Akademicheskaya Str., 220012, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [lbelysheva@gmail.com](mailto:lbelysheva@gmail.com)