

## Разработка и валидация методики определения амитраза и его метаболитов в мёде методом ВЭЖХ–МС/МС

**\*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>РУП «Научно-практический центр гигиены»,  
Республика Беларусь, 220012, г. Минск, ул. Академическая, 8

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет,  
Республика Беларусь, 220006, г. Минск, ул. Ленинградская, д. 14

\*Адрес для переписки: Полоневич Анна Геннадьевна, E-mail: gannapalanevich@gmail.com

Поступила в редакцию 12 июня 2023 г., после доработки 10 июля 2023 г.

Разработали и валидировали селективную, простую в реализации, экспрессную методику совместного определения в мёде остаточного содержания инсектицида амитраз и трех его метаболитов (ДМФФ, ДМФ и ДМА). Методика основана на жидкость-жидкостной экстракции аналитов дихлорметаном из водного раствора мёда, подщелоченного аммиаком для улучшения стабильности лабильного в кислой среде инсектицида в процессе пробоподготовки. Получаемые экстракты достаточно чистые и не требуют дополнительной очистки с использованием твердофазной экстракции либо ее вариантов. Выбор экстрагента основан на предварительном изучении распределения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в экстракционных системах вода – органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ). Количественное определение осуществляется методом ВЭЖХ–МС/МС в режиме мониторинга множественных реакций с использованием матричной градуировки в диапазоне массовой доли аналитов в мёде от 25 до 250 мкг/кг. Значения предела обнаружения в зависимости от аналита составляют от 0.2 до 2.3 мкг/кг, предела определения – от 0.6 до 4.6 мкг/кг, относительного стандартного отклонения повторяемости – от 1.4 до 5.8 %, относительного стандартного отклонения промежуточной прецизионности – от 1.4 до 7.7 %, относительной расширенной неопределенности – от 9 до 22 %. Градуировочные графики линейны в диапазоне массовой доли аналитов в мёде от 25 до 250 мкг/кг. Также в процессе валидации оценили инструментальные пределы обнаружения и определения, матричный эффект, степень извлечения, общую эффективность процесса, смещение.

**Ключевые слова:** амитраз, метаболиты, жидкость-жидкостная экстракция, ВЭЖХ–МС/МС, мёд.

For citation: Analitika i kontrol' [Analytics and Control], 2023, vol. 27. no. 3, pp. 180-191

DOI: 10.15826/analitika.2023.27.3.006

## Development and validation of a method for determining amitraz and its metabolites in honey using HPLC–MS/MS method

**\*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, 8 Akademicheskaya St., Minsk, 220012, Republic of Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University, 14 Leningradskaya St., Minsk, 220006, Republic of Belarus

\*Corresponding author: Anna G. Polonevich, E-mail: gannapalanevich@gmail.com

Submitted 12 June 2023, received in revised form 10 July 2023

A selective, easy-to-implement, express method for the simultaneous determination of amitraz and its metabolites residual content in honey in the range of analytes mass fraction from 25 to 250 µg/kg has been developed and validated. The technique is based on the analytes liquid-liquid extraction with dichloromethane from alkalized aqueous solutions of honey to improve the stability of the acid-labile insecticide during sample preparation. The resulting extracts are sufficiently pure and do not require additional purification using solid-phase extraction or its variants. The extractant choice is based on a preliminary study of amitraz, DMFF, DMF and DMA distribution in water-organic solvent (*n*-hexane, toluene, dichloromethane, chloroform) extraction

systems. Quantitative determination is carried out with HPLC–MS/MS in multiple reactions monitoring mode using matrix calibration in the range of the mass fraction of analytes in honey from 25 to 250 µg/kg. Depending on the analyte, the values of the detection limit ranged from 0.2 to 2.3 µg/kg, the limit of determination was from 0.6 to 4.6 µg/kg, the relative standard deviation of the repeatability – from 1.4 to 5.8 %, relative standard deviation of intermediate precision – from 1.4 to 7.7 %, relative expanded uncertainty – from 9 to 22 %. Calibration graphs were linear in the range from 25 to 250 µg/kg. The instrumental limits of detection and determination, the matrix effect, the degree of extraction, the overall efficiency of the process, and the bias were also evaluated in the course of the validation process.

**Keywords:** amitraz, metabolites, liquid-liquid extraction, HPLC–MS/MS, honey.

## ВВЕДЕНИЕ

Инсектицид амитраз используют в пчеловодстве для борьбы с клещем *Varroa*, вызывающим у пчел заболевание варроатоз. Данное вещество является лабильным, разрушается как в мёде, так и в водных растворах. Амитраз и его основные метаболиты – N-(2,4-диметилфенил)-N'-метилимидоформамид (ДМФФ), N-(2,4-диметилфенил)формамид (ДМФ) и 2,4-диметиланилин (ДМА) – токсичны для человека [1–7]. Остаточное содержание данных веществ в мёде регламентировано: максимально допустимый уровень суммы остатков амитраза и его метаболитов, содержащих 2,4-диметиланилиновую группу, составляет 200 мкг/кг [8–10].

Как правило, методики определения данных контаминантов предполагают в процессе пробоподготовки использовать готовые наборы QuEChERS или их отдельные составляющие [2, 11–14], картриджи для твердофазной и жидкость-жидкостной экстракции на твердом носителе [15–16]. Однако данные расходные материалы не всегда доступны. Предложен ряд трудоемких, многостадийных методик, основанных на гидролизе экстрагированных амитраза и его метаболитов до ДМА [5, 11, 17–19]. Также опубликованы методики, основанные на жидкость-жидкостной экстракции без дополнительных этапов очистки [3, 5]: [3] предназначена только для определения амитраза и ДМА, в [5] применяют в качестве экстрагента этилацетат, способный экстрагировать из мёда мешающие компоненты матрицы. Для определения амитраза в мёде ранее разработали и валидировали методику, основанную на жидкость-жидкостной экстракции *n*-гексаном [20], не способным эффективно извлекать метаболиты, в частности ДМФ.

Таким образом, для рутинного контроля остаточного содержания амитраза и трех его основных метаболитов целесообразна разработка селективной, чувствительной методики, доступной и удобной в исполнении, что может быть обеспечено сочетанием жидкость-жидкостной экстракции и количественного определения с помощью tandemной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ–МС/МС). В связи с этим ранее оценили константы распределения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА для экстракционных систем вода – органический растворитель (*n*-гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ) [21]. На основании анализа полученных результатов заключили, что дихлорметан является оптимальным

экстрагентом для данных контаминантов, поскольку эффективно извлекает аналиты и при этом не экстрагирует большинство матричных компонентов мёда, в результате не требуется дополнительная очистка. Также дихлорметановые экстракты могут быть быстро сконцентрированы упариванием при невысокой температуре.

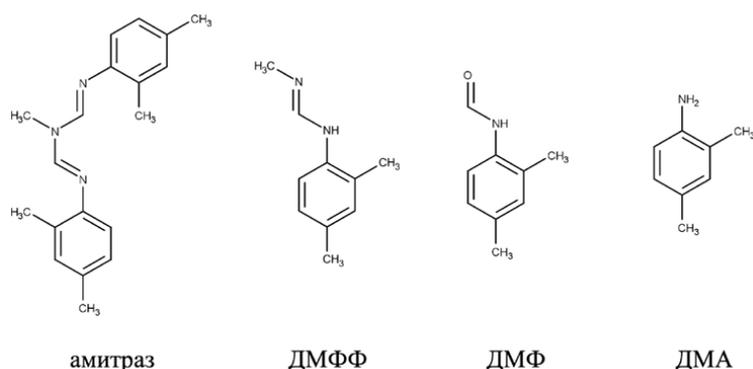
Цель этой работы – создать и валидировать экспрессную и доступную для рутинных исследований методику одновременного определения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в мёде с использованием жидкость-жидкостной экстракции, не требующей очистки получаемых экстрактов, и метода ВЭЖХ–МС/МС.

## МАТЕРИАЛЫ, АППАРАТУРА И МЕТОДЫ

В качестве стандартных образцов использовали амитраз массовой долей 99.2 % производства LGC Labor GmbH (Dr Ehrenstorfer) (Германия) и амитраз-D<sub>3</sub> массовой долей 99.5 % производства Witega (Германия); ДМФФ массовой долей 100.0 % производства British Pharmacopoeia Commission Laboratory (Великобритания), ДМФ массовой долей 99.9 % и ДМА массовой долей 99.4 % производства Sigma-Aldrich (США). Структурные формулы амитраза и его метаболитов представлены на рис. 1.

Применяли ацетонитрил для ВЭЖХ (≥ 99.9 %, Carlo Erba, Франция), дихлорметан для ВЭЖХ (≥ 99.9 %, Carlo Erba, Франция), муравьиную кислоту (98 %, Acros Organics, Бельгия), аммиак водный ч.д.а. (АО «База № 1 Химреактивов», Россия). Деионизованную воду получали с помощью системы очистки воды Easy pure II RF/UV (Thermo Scientific, США). Для валидации использовали «чистые» образцы мёда с частных пасек (цветочный, разнотравье, гречишный), проанализированные на содержание амитраза и его метаболитов согласно разработанной методике. 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 Vap (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



**Рис. 1.** Структурные формулы амитраза и его метаболитов

**Fig. 1.** Structural formula of amitraz and its metabolites

(Agilent Technologies, Германия). В качестве неподвижной фазы использовали обращенно-фазовую 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 % раствор муравьиной кислоты в воде (А) и смесь ацетонитрила и метанола в объемном соотношении 8 : 2 (В). Хроматографическое разделение осуществляли в режиме градиентного элюирования, при котором объемная доля компонента подвижной фазы В изменялась следующим образом: 0 – 0.7 мин – 10 %, 0.7 – 2.7 мин – от 10 до 95 %, 2.7 – 10.0 мин – 95 %, 10.0 – 10.1 мин – от 95 до 10 %, с 10.1 мин – 10 %. 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 – 310 кПа. Параметры воздействия на ионы амитраза, его метаболитов и амитраза-D<sub>3</sub> в режиме мониторинга множественных реакций *MRM* (значения отношения массы и заряда *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.

Подготовку образцов мёда осуществляли следующим образом. К навеске мёда массой 1.0 г, взвешенной в центрифужной пробирке, вносили аликвоту раствора амитраза-D<sub>3</sub> в качестве внутреннего стандарта из расчета его содержания 200 мкг/кг. Затем приливали 2 мл (250 ± 20) мМ водного раствора аммиака и перемешивали до растворения мёда. Добавляли 5 мл дихлорметана и экстрагировали аналиты в течение (4 ± 1) мин при умеренном перемешивании. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 10000 об/мин при 18 – 22 °С. Водный слой отбрасывали. Органический экстракт количественно переносили в чистую пробирку и упаривали в токе азота при 30 – 35 °С до влажного остатка. Остаток растворяли в 2 мл 50 мМ раствора аммиака в водно-ацетонитрильной смеси (1:1, по объему) в течение 5 – 8 мин. Полученный раствор фильтровали через мембранный шприцевой фильтр из регенерированной целлюлозы для последующего исследования методом ВЭЖХ–МС/МС. Количественное определение проводили с использованием матричных градуировочных растворов, проведенных через всю пробоподготовку. Массовая доля аналитов в градуировочных растворах составляла от 25 до 250 мкг/кг каждого. Расчет содержания амитраза осуществляли с и без использования внутреннего стандарта.

При проведении валидации методики оценивали селективность, матричный эффект, степень извлечения, общую эффективность процесса, инструментальные пределы обнаружения и определения, предел обнаружения, предел определения, рабочий диапазон, повторяемость, внутрिलाбораторную воспроизводимость, смещение, неопределенность результатов.

Достижение высокой *селективности* обеспечили выбором тандемной хромато-масс-спектрометрии для инструментального детектирования

**Таблица 1**

Параметры воздействия на ионы амитраза, его метаболитов и амитраза-D<sub>3</sub> в режиме *MRM*

**Table 1**

Parameters of action on amitraz, its metabolites and amitraz-D<sub>3</sub> ions in the *MRM* mode

Наименование вещества	<i>m/z</i> родительского иона	<i>m/z</i> дочернего иона	Энергия соударений, В
Амитраз	294	163 / 122 / 107	13 / 34 / 50
Амитраз-D <sub>3</sub>	297	166	14
ДМФФ	163	122 / 107	18 / 26
ДМФ	150	132 / 107 / 77	13 / 23 / 46
ДМА	122	107 / 79 / 77	18 / 26 / 30

целевых соединений. Для проверки селективности метода проводили исследования восьми различных образцов мёда для выявления на их хроматограммах сигналов, потенциально способных исказить хроматографические пики аналитов.

Для оценивания *степени извлечения R*, *матричного эффекта ME* и *общей эффективности процесса PE* (включает *R* и *ME*) использовали растворы амитраза, его метаболитов и дейтерированного амитраза-D<sub>3</sub>: растворы в чистом растворителе («solvent standards», SS); матричные растворы, полученные внесением аналитов и внутреннего стандарта к навескам образца «чистого» мёда перед началом экстрагирования («pre-extraction standards», PreES); матричные растворы, приготовленные с использованием экстрактов образца «чистого» мёда («post-extraction standards», PostES).

Содержание соединений во всех растворах характеризовалось одинаковыми приписанными концентрациями аналитов: 12.5, 40, 70, 95 и 125 нг/мл, что соответствует значениям массовой доли в мёде равным 25, 80, 140, 190 и 250 мкг/кг. Приписанная концентрация дейтерированного амитраза во всех растворах составляла 100 нг/мл (200 мкг/кг мёда). Растворителем являлась смесь ацетонитрил – 100 мМ водный раствор аммиака (1 : 1, по объему). С использованием данных растворов методами регрессионного анализа были получены градуировочные зависимости типа  $y = a + bx$  и  $y = bx$ .

Оценки *PE*, *R* и *ME* получали двумя способами:

1) на основании сравнения значений угловых коэффициентов *b* для амитраза и его метаболитов:

$$R = \frac{b_{PreES}}{b_{PostES}} \times 100, \quad (1)$$

$$ME = \frac{b_{PostES}}{b_{SS}} \times 100, \quad (2)$$

$$PE = \frac{b_{PreES}}{b_{SS}} \times 100; \quad (3)$$

2) на основании сравнения площадей хроматографических пиков *S* для амитраза-D<sub>3</sub>:

$$R = \frac{S_{PreES}}{S_{PostES}} \times 100, \quad (4)$$

$$ME = \frac{S_{PostES}}{S_{SS}} \times 100, \quad (5)$$

$$PE = \frac{S_{PreES}}{S_{SS}} \times 100. \quad (6)$$

*Инструментальные пределы обнаружения iLOD* и *определения iLOQ* оценивали для каждого из дочерних ионов амитраза согласно [22] по формулам

$$iLOD = 3.3 \times \frac{s_0}{b}, \quad (7)$$

$$iLOQ = 10 \times \frac{s_0}{b}, \quad (8)$$

где  $s_0$  – остаточное стандартное отклонение регрессии, усл. ед.,  $b$  – коэффициент регрессии градуировочного графика, усл. ед. · (нг/мл)<sup>-1</sup>. Для расчета  $s_0$  и  $b$  использовали градуировочные растворы в чистом растворителе концентрациями, охватывающими ожидаемые значения пределов.

*Предел обнаружения LOD* и *предел определения LOQ* аналитов в мёде рассчитывали на основании полученных значений инструментальных пределов и общей эффективности процесса:

$$LOD = iLOD \times \frac{100}{PE}, \quad (9)$$

$$LOQ = iLOQ \times \frac{100}{PE}. \quad (10)$$

Для оценки *рабочего диапазона* методики готовили матричные градуировочные растворы PreES. Для всех определяемых соединений устанавливали зависимость площади пика от их массовой доли в мёде. Для амитраза также устанавливали зависимость относительной площади пика (отношение площадей пиков амитраза и амитраза-D<sub>3</sub>) от соответствующей относительной массовой доли амитраза в мёде (отношение массовой доли амитраза к массовой доле амитраза-D<sub>3</sub>). Рассчитывали коэффициенты регрессии для зависимостей типа  $y = a + bx$  и типа  $y = bx$  при установлении не значимого отличия от нуля свободного коэффициента регрессии  $a$ . Линейность проверяли путем сравнения отношения дисперсии *MSSL*, связанной с неадекватностью аппроксимации, и дисперсии *MSSP*, связанной с неповторяемостью, с помощью критерия Фишера  $F = MSSL/MSSP$  [23] с соответствующим критическим значением  $F_{crit}$ . Рассчитывали значения коэффициента детерминации  $R^2$ .

*Прецизионность (повторяемость и внутрилабораторную воспроизводимость)* и *правильность* изучали с использованием трех образцов мёда ( $p = 3$ ) с добавками амитраза и его метаболитов из расчета содержания каждого из веществ  $w = 30$  и  $220$  мкг/кг образца. Для каждого  $k$ -го ( $k = \overline{1, p}$ ) образца мёда на каждом уровне проводили от 6 до 8 исследований ( $n_k = 6$  или  $8$ ). Для внесения добавок использовали чистые образцы мёда, предварительно проверенные на содержание аналитов.

Результаты на каждом уровне внесения для каждого образца мёда  $x_{ki}$  проверяли на выбросы по критерию Граббса согласно [24]. В качестве оценок стандартного отклонения повторяемости  $s_r$  для каждого уровня внесения использовали средневзвешенные стандартные отклонения, рассчитанные на основании значений, полученных для каждого образца мёда  $s_k$ :

$$s_k = \sqrt{\frac{1}{n_k - 1} \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ki} - \bar{x}_k)^2}, \quad (11)$$

$$s_r = \sum_{k=1}^p (n_k - 1) \times s_k^2 / \sum_{k=1}^p (n_k - 1), \quad (12)$$

где  $\bar{x}_k$  – среднее арифметическое результатов, полученных для  $k$ -го образца на заданном уровне внесения.

Значения  $s_k$  проверяли на однородность с помощью критерия Кохрена с использованием критических значений для количества результатов в выборках равного восьми [24].

Стандартное отклонение внутрилабораторной воспроизводимости  $s_{RW}$  рассчитывали следующим образом:

$$s_{RW} = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}, \quad (13)$$

где

$$s_L^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{\bar{n}}, \quad (14)$$

$$s_d^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{k=1}^p n_k (\bar{x}_k - \bar{x})^2, \quad (15)$$

$$\bar{n} = \frac{1}{p} \times \left( \sum_{k=1}^p n_k - \sum_{k=1}^p n_k^2 / \sum_{k=1}^p n_k \right), \quad (16)$$

где  $\bar{x}$  – среднее арифметическое всех результатов, полученных для всех образцов мёда на заданном уровне внесения [24].

Правильность количественно оценивали по смещению  $bias_k$ , рассчитанному по результатам исследования проб с добавками  $\gamma$ :

$$bias_k = \bar{x}_k - \gamma. \quad (17)$$

Для установления значимости отличия  $bias_k$  от нуля, применяли статистический критерий  $t$ :

$$t = \frac{|bias_k|}{\sqrt{\frac{s_r k^2}{n_k} + u(\gamma)^2}}, \quad (18)$$

где  $u(\gamma)$  – неопределенность приписанного значения содержания аналита в пробах с внесением добавки, рассчитанная на основании механизма приготовления проб.

Полученное значение  $t$  сравнивали с критическим значением двустороннего распределения Стьюдента  $t_{crit}$  для уровня доверия 0,95 (уровня значимости 0,05) и числа степеней свободы  $f = n_k - 1$ . Значение  $t < t_{crit}$  свидетельствовало о том, что смещение не значимо отличается от нуля, значение  $t \geq t_{crit}$  – о том, что смещение значимо.

Суммарную стандартную неопределенность  $u_c$  для каждого уровня рассчитывали согласно [25]

на основании оценок неопределенности, связанной со случайными факторами – стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости  $s_{RW}$  и неопределенности, обусловленной возможным смещением  $u(bias)$ :

$$u_c = \sqrt{s_{RW}^2 + u(bias)^2}. \quad (19)$$

Неопределенность  $u(bias)$ , обусловленную возможным смещением, оценивали для каждого уровня внесения следующим образом:

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(\gamma)^2}, \quad (20)$$

где  $RMS_{bias}$  – среднее квадратичное индивидуальных значений смещения  $bias_k$ :

$$RMS_{bias} = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p bias_k^2}. \quad (21)$$

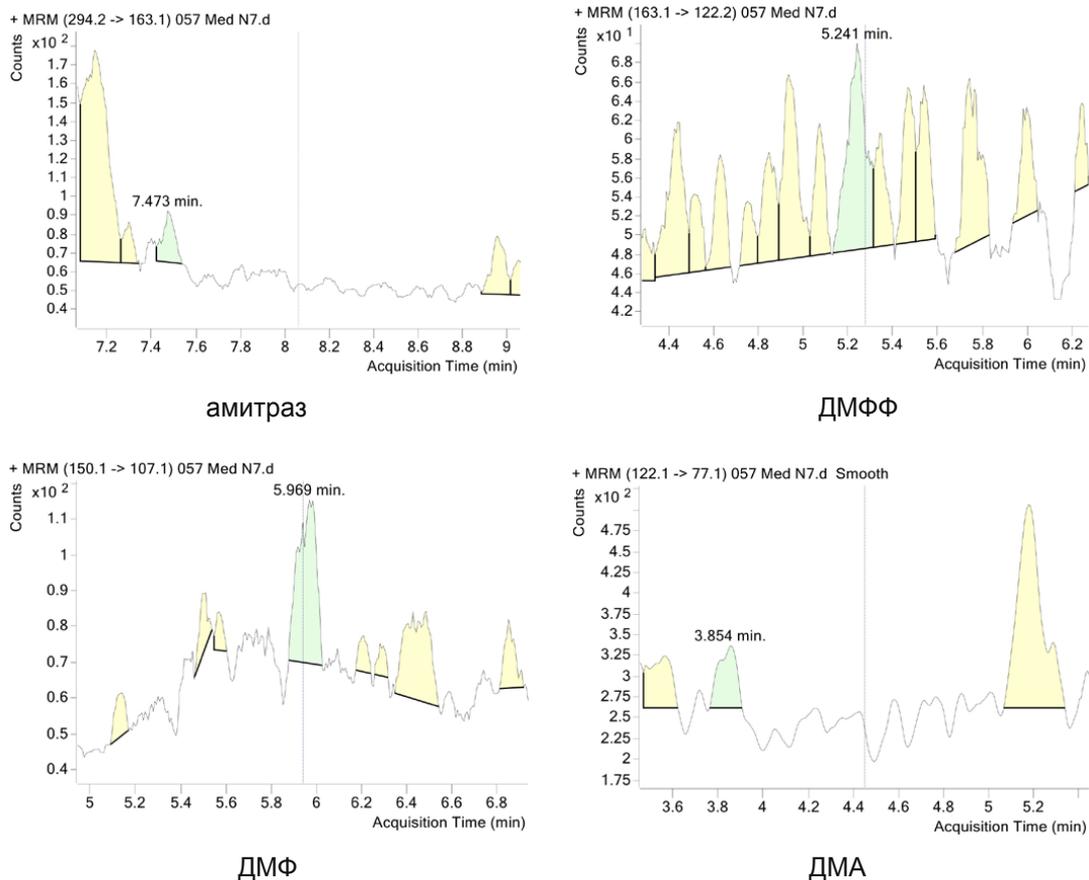
Расширенную неопределенность  $U$  ( $P = 95\%$ ,  $k = 2$ ) рассчитывали по формуле

$$U = 2u_c. \quad (22)$$

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор органического растворителя для разработки методики совместного определения амитраза и трех его метаболитов методом жидкость-жидкостной экстракции основывался на результатах изучения распределения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в экстракционных системах вода – органический растворитель ( $n$ -гексан, толуол, дихлорметан, хлороформ) [21]. Также учитывали результаты изучения стабильности амитраза в водно-ацетонитрильных (1 : 1, по объему) растворах с различными добавками [21]. Поскольку амитраз лабилен при низких значениях pH, а растворы мёда имеют кислую среду, для улучшения стабильности амитраза в процессе пробоподготовки, а также для перевода амитраза, ДМФФ и ДМА в непротонированную молекулярную форму ( $pK_{a1} = 8.4$  и  $pK_{a2} = 9.0$  для амитраза,  $pK_a = 8.8$  для ДМФФ и  $pK_a = 4.9$  для ДМА – рассчитаны для 20 °С в программе MarvinSketch, версия 23.5, год выпуска 2023) навеску мёда растворяли в водном растворе аммиака. Также для улучшения кратковременной стабильности амитраза при нахождении в автосамплере прибора, при получении конечного раствора, анализируемого методом ВЭЖХ–МС/МС, использовали водно-ацетонитрильный раствор аммиака.

Среди изученных растворителей для извлечения самого инсектицида достаточным является использование  $n$ -гексана, поскольку константа распределения  $P$  для системы вода –  $n$ -гексан чрезвычайно высока (логарифм константы распределения  $\lg P = 5.10$ ), что позволяет однократной



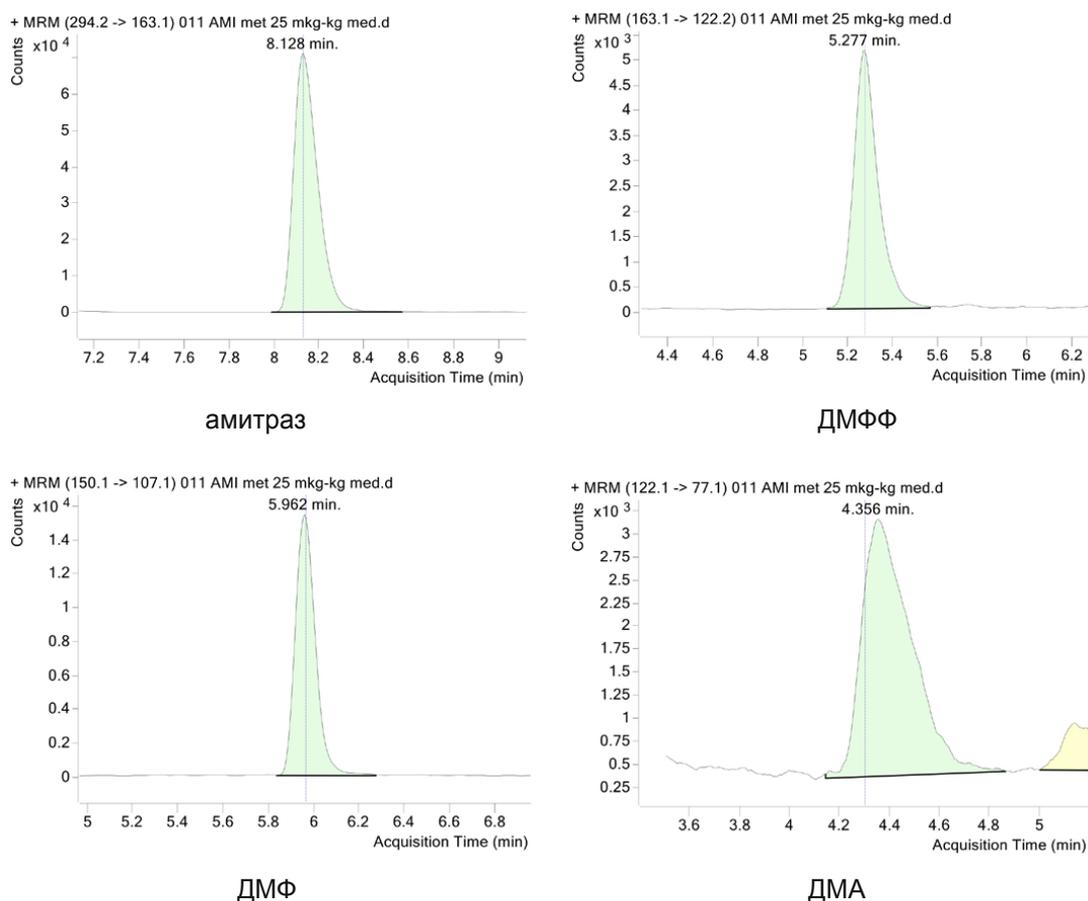
**Рис. 2.** Хроматограммы, полученные для образца мёда  
**Fig. 2.** Chromatograms obtained for the honey sample

экстракцией даже объемом растворителя в 10 раз меньшим объема водной фазы извлечь более 99.9 % амитраза. Также двукратным избытком *n*-гексана относительно водного раствора можно добиться количественного извлечения ( $\geq 95\%$ ) ДМФФ ( $\lg P = 0.94$ ) и ДМА ( $\lg P = 1.03$ ). Однако при упаривании гексановых экстрактов ДМА регулярно наблюдаются его потери, непостоянные по величине. В отношении ДМФ *n*-гексан не эффективен:  $\lg P = -0.36$  и 95 % извлечение ДМФ однократной экстракцией может быть достигнуто лишь при соотношении объема *n*-гексана к водной фазе равном сорока трем. Таким образом, *n*-гексан может быть использован для извлечения амитраза и только одного его метаболита ДМФФ, что недостаточно с учетом нормирования инсектицида как суммы остатков амитраза и его метаболитов, содержащих 2,4-диметиланилиновую группу [8–10].

Для совместного определения амитраза и трех его метаболитов толуол, дихлорметан и хлороформ принципиально подходят. При переходе от *n*-гексана к толуолу константы распределения увеличиваются в 6.5–25 раз, но из-за высокой температуры кипения использование толуола не представляет практического интереса. Переход от толуола к хлоралканам приводит к дальнейшему увеличению констант в 2.5–6.7 раза. Из двух растворителей остановили выбор на дихлорметане в силу его более низкой

температуры кипения, что удобно для быстрого концентрирования экстракта упариванием. Потеря ДМА при упаривании дихлорметановых экстрактов не наблюдали.

Таким образом, дихлорметан является оптимальным для одновременного извлечения данных соединений из водных растворов мёда. Согласно полученных оценок констант распределения 95 % экстрагирования наименее извлекаемого ДМФ ( $\lg P = 1.7$ ) можно достичь при соотношении органической и водной фаз равном 1 : 3. Для выполнения исследований с учетом периодического формирования взвеси вблизи границы раздела фаз в дихлорметановом слое приняли решение использовать органический растворитель в большем объеме относительно объема водного раствора мёда. Для улучшения разделения фаз экстрагирование осуществляли при умеренном перемешивании, а центрифугирование без охлаждения – при температуре 18–22 °С. В случае формирования взвеси, мешающей количественно отделить органический слой, для последующего анализа отбирали аликвоту экстракта и с учетом объема аликвоты корректировали объем водно-ацетонитрильного раствора аммиака, необходимый для растворения упаренного экстракта. Получаемые дихлорметановые экстракты достаточно чистые для инструментального анализа и не требуют дополнительной очистки методами



**Рис. 3.** Хроматограммы, полученные для образца мёда добавкой аналитов на уровне 25 мкг/кг каждого

**Fig. 3.** Chromatograms obtained for the honey sample with added analytes at 25 µg/kg each

твердофазной экстракции, в том числе дисперсионной твердофазной экстракции, являющейся второй стадией QuEChERS.

**Селективность** разработанной методики подтвердили результатами исследований восьми «чистых» образцов мёда. На полученных хроматограммах выявляли пики, потенциально способные исказить аналитические сигналы аналитов: подобные сигналы обнаружены не были. Хроматограммы для наиболее интенсивных MRM переходов каждого аналита для образца мёда без внесения аналитов и образца мёда с добавкой аналитов из расчета 25 мкг/кг представлены на рис. 2 и 3.

Полученные значения оценок *степени извлечения R*, *матричного эффекта ME* и *общей эффективности процесса PE* приведены табл.2.

Как видно из табл. 2, значения общей эффективности процесса PE составили 75 % для ДМФ, 82 % для амитраза-D<sub>3</sub>, 83 % для амитраза, 86 % для ДМФФ и 87 % для ДМА. Степень извлечения R составила от 90 % для ДМА до 99 % для ДМФ, матричного эффекта ME – от 76 % для ДМФ до 97 % для ДМА. Таким образом, отличие общей эффективности процесса от 100 % для амитраза, амитраза-D<sub>3</sub> и ДМФ в большей степени обусловлено влиянием матричного эффекта, для ДМА и ДМФФ – потерями в процессе пробоподготовки. Относительные

вклады степени извлечения и матричного эффекта в итоговые значения PE проиллюстрированы рис. 4.

Поскольку степень извлечения R амитраза и ДМФ приемлема, то для их количественного определения достаточно использовать градуировочные растворы PostES, приготовленные с использованием итоговых экстрактов чистого образца мёда, для компенсации матричного эффекта. Однако значительное отличие R от 100 % для ДМФФ и ДМА обусловило недостаточность такого подхода и необходимость градуировки с использованием растворов PreES, проведенных через всю процедуру пробоподготовки. Также, поскольку оценки PE для

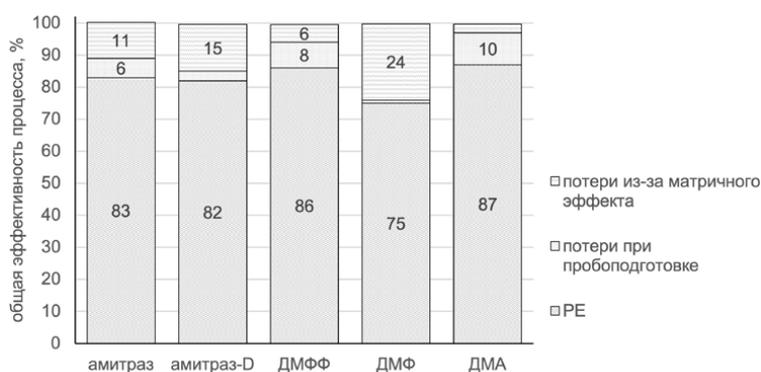
**Таблица 2**

Оценки степени извлечения R, матричного эффекта ME и общей эффективности процесса PE

**Table 2**

Estimates of degree of recovery R, matrix effect ME, and process efficiency PE

Вещество	R, %	ME, %	PE, %
Амитраз	94	88	83
Амитраз-D <sub>3</sub>	97	85	82
ДМФФ	92	94	86
ДМФ	99	76	75
ДМА	90	97	87



**Рис. 4.** Общая эффективность процесса и влияние пробоподготовки и матричного эффекта на ее значение

**Fig. 4.** Total process efficiency and influence of sample preparation and matrix effect on its value

**Таблица 3**

Значения пределов определения и обнаружения

**Table 3**

Values of limits of detection and determination

Вещество	<i>i</i> -LOD, нг/мл	<i>i</i> -LOQ, нг/мл	LOD, мкг/кг	LOQ, мкг/кг
Амитраз	0.09	0.27	0.2	0.6
ДМФФ	0.22	0.62	0.5	1.4
ДМФ	0.15	0.45	0.4	1.2
ДМА	1.0	2.0	2.3	4.6

амитраза и амитраза-D<sub>3</sub> незначительно отличались друг от друга, амитраз-D<sub>3</sub> возможно использовать в качестве внутреннего стандарта для амитраза.

Полученные значения *инструментальных пределов обнаружения и определения*, а также *пределов обнаружения и определения* методики приведены в табл. 3.

Рассчитанные для оценки линейности *рабочего диапазона* характеристики градуировочных графиков, построенных с использованием матричных градуировочных растворов PreES, представлены в табл. 4.

Как видно из табл. 4, для амитраза, ДМФФ и ДМА установлена незначимость коэффициента *a* (*a* = 0), следовательно, для количественного определения могут быть использованы графики типа

$y = bx$ . Для всех графиков сделан вывод о линейности во всем диапазоне измерения на основании проверки по критерию Фишера. Значения коэффициента детерминации  $R^2$  составили от 0.995 до 0.999. Обратно рассчитанные по полученным графикам концентрации всех градуировочных растворов не отклонялись от приписанных значений более чем на 10 %, что соответствует требованиям [26]. Таким образом, все графики пригодны для количественного определения.

Полученные относительные стандартные отклонения  $s_k$  и смещения  $bias_k$  для каждого *k*-го образца мёда на каждом уровне внесения и результаты проверки значимости смещения представлены в табл. 5.

Представленные значения стандартных отклонений  $s_k$  использованы при проверке значимости смещений  $bias_k$ , проверены на однородность согласно критерию Кохрена и вошли в расчет средневзвешенных стандартных отклонений повторяемости  $s_r$ .

Независимо от способа расчета содержания амитраза все значения смещения незначимо отличались от нуля: с использованием метода внутреннего стандарта они составили от – 4.8 % до – 1.5 %, без использования метода внутреннего стандарта – от – 4.1 % до 2.1 %. Односторонность значений смещения в первом случае свидетельствовала о предпочтительности использования изотопно-меченного амитраза для количествен-

**Таблица 4**

Параметры градуировочных графиков

**Table 4**

Calibration curves parameters

Вещество	Диапазон, мкг/кг	<i>a</i>	<i>b</i>	$R^2$	<i>F</i>	$F_{crit}$
Амитраз	25 – 250	0	$2.76 \cdot 10^4$	0.998	1.28	< 5.19
Амитраз/амитраз-D <sub>3</sub>	25 – 250	0	0.888	0.999	1.49	< 5.19
ДМФФ	25 – 250	0	$1.56 \cdot 10^3$	0.997	1.18	< 5.19
ДМФ	25 – 250	$5.77 \cdot 10^4$	$2.11 \cdot 10^3$	0.995	1.16	< 5.41
ДМА	25 – 250	0	$2.08 \cdot 10^3$	0.999	2.31	< 5.19

Таблица 5

Оценки относительных стандартных отклонений повторяемости и смещения для каждого образца меда на каждом уровне внесения, установление значимости смещения

Table 5

Estimates of relative standard deviations of repeatability and bias for each honey sample at each addition level, evaluation of the bias significance

Вещество	$w$ , мкг/кг	$k$	$s_{k'}$ , %	$bias_{k'}$ , %	$t$	Результат сравнения $t < t_{crit}$	Гистограмма значений смещений
Амитраз (расчет без использования внутреннего стандарта)	30	1	2.4	-4.8	1.6	$t < t_{crit}$	
		2	2.7	-4.1	1.3	$t < t_{crit}$	
		3	3.5	-4.2	1.3	$t < t_{crit}$	
	220	1	1.8	-1.5	0.5	$t < t_{crit}$	
		2	2.8	-2.3	0.7	$t < t_{crit}$	
		3	1.9	-4.7	1.6	$t < t_{crit}$	
Амитраз (расчет с использованием внутреннего стандарта)	30	1	1.8	-4.1	1.4	$t < t_{crit}$	
		2	1.2	-3.4	1.1	$t < t_{crit}$	
		3	1.1	-2.8	1.0	$t < t_{crit}$	
	220	1	3.3	2.1	0.7	$t < t_{crit}$	
		2	2.4	1.0	0.3	$t < t_{crit}$	
		3	1.6	-1.1	0.4	$t < t_{crit}$	
ДМФФ	30	1	3.6	-9.6*	2.9	$t > t_{crit}$	
		2	6.6	1.6	0.4	$t < t_{crit}$	
		3	3.6	-7.6	2.4	$t < t_{crit}$	
	220	1	2.1	2.4	0.8	$t < t_{crit}$	
		2	2.2	-1.9	0.6	$t < t_{crit}$	
		3	2.0	-1.4	0.5	$t < t_{crit}$	
ДМФ	30	1	5.3	-4.7	1.3	$t < t_{crit}$	
		2	6.0	-10.8*	2.9	$t < t_{crit}$	
		3	5.9	-6.0	1.7	$t < t_{crit}$	
	220	1	1.9	2.1	0.7	$t < t_{crit}$	
		2	3.0	-2.0	0.6	$t < t_{crit}$	
		3	2.6	-0.8	0.3	$t < t_{crit}$	
ДМА	30	1	2.7	-8.0*	2.6	$t > t_{crit}$	
		2	3.7	-4.4	1.4	$t < t_{crit}$	
		3	4.3	-0.7	0.2	$t < t_{crit}$	
	220	1	1.1	2.6	0.9	$t < t_{crit}$	
		2	2.1	-1.7	0.6	$t < t_{crit}$	
		3	2.2	1.4	0.5	$t < t_{crit}$	

Примечание: смещения, значимо отличные от нуля, помечены "\*" и отображены черным цветом на гистограммах.

ного определения. Оценки смещения для ДМФФ изменялись в диапазоне от - 9.6 % до 2.4 %. для ДМФ – от - 10.8 % до 2.1 %. для ДМА – от - 8.0 % до 2.6 %. Наименьшие полученные значения смещения для каждого метаболита значимо отличались от нуля, однако все полученные оценки принадлежали допустимому согласно [26] интервалу от -30 % до +20 %. Таким образом, принято решение об учете

всех полученных оценок смещения посредством  $RMS_{bias}$  в суммарной стандартной неопределенности результатов и, как следствие, об отсутствии необходимости использовать дополнительные поправочные коэффициенты, что предусмотрено в [27].

Результаты оценивания относительных значений стандартного отклонения повторяемости  $s_r$  и внутрिलाбораторной воспроизводимости  $s_{RW}$

Таблица 6

Оценки среднеквадратичного смещения, относительных стандартных отклонений повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости, суммарной стандартной и расширенной неопределенности результатов

Table 6

Estimates of mean square root bias, relative standard deviations of repeatability and inter-laboratory reproducibility, combined standard and expanded uncertainty of the results

Вещество	$w$ , мкг/кг	$RMS_{bias}$ , %	$u(bias)$ , %	$s_r$ , %	$s_{RW}$ , %	$u_c$ , %	$U$ , %
Амитраз (расчет без использования внутреннего стандарта)	30	4.4	5.3	3.0	3.0	6.1	12
	220	3.2	4.3	2.2	2.7	5.0	10
Амитраз (расчет с использованием внутреннего стандарта)	30	3.5	4.6	1.4	1.4	4.8	10
	220	1.5	3.2	2.4	2.8	4.3	9
ДМФФ	30	7.1	7.7	4.8	7.5	10.8	22
	220	1.9	3.5	2.1	3.0	4.6	9
ДМФ	30	7.6	8.1	5.8	6.3	10.3	21
	220	1.7	3.3	2.6	3.1	4.5	9
ДМА	30	5.3	6.0	3.8	5.2	8.0	16
	220	2.0	3.4	2.1	7.7	8.4	17

среднеквадратичного смещения  $RMS_{bias}$ , стандартной неопределенности, обусловленной смещением  $u(bias)$ , суммарной стандартной неопределенности  $u_c$  и расширенной неопределенности  $U$  для уровня доверия  $P = 95\%$  приведены в табл. 6.

Как видно из табл. 6, максимальные значения стандартного отклонения повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости составили 5.8 % (ДМФ,  $w = 30$  мкг/кг) и 7,7 % (ДМА,  $w = 220$  мкг/кг) соответственно, что удовлетворяет требованию о не превышении 20 % значений  $s_r$  и  $s_{RW}$  [26]. Оценки относительной расширенной неопределенности результатов содержания амитраза составили от 9 % до 12 % и не отличались значительно от уровня добавки и способа расчета. Значения расширенной неопределенности для ДМФФ и ДМФ на нижнем уровне внесения (22 % и 21 %) превосходили значения, полученные для верхнего уровня (9 %). Расширенная неопределенность для ДМА не зависела от содержания аналита и составила 16 % и 17 %. Таким образом, все полученные оценки соответствуют требованию о том, что расширенная неопределенность не должна превышать 50 % [26].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана приемлемая для рутинных исследований методика одновременного определения амитраза, ДМФФ, ДМФ и ДМА в мёде, основанная на жидкость-жидкостной экстракции дихлорметаном и количественном определении методом ВЭЖХ–МС/МС с использованием матричных градуировочных растворов, проведенных через всю пробоподготовку, в диапазоне значений массовой доли аналитов в мёде от 25 до 250 мкг/кг. Методика проста в исполнении,

не требует дополнительной очистки экстрактов, включает использование только широко доступных материалов и реактивов. В ходе валидации оценены неопределенность получаемых результатов и следующие рабочие характеристики методики: селективность, матричный эффект, степень извлечения, общая эффективность процесса, инструментальные пределы обнаружения и определения, предел обнаружения, предел определения, рабочий диапазон, повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость, смещение. Отмечено, что разработанная методика выгодно отличается от действующего стандарта [14] определения амитраза в диапазоне его массовой доли в мёде от 10 до 1000 мкг/кг, представляющего собой модифицированный метод QuEChERS, тем, что позволяет помимо амитраза определять и его метаболиты, что требуется законодательством [8–10]; не включает использования импортируемых сорбентов (C18, PSA); характеризуется меньшей расширенной неопределенностью результатов определения амитраза: 9 – 12 % против 29 – 51 %.

## ЛИТЕРАТУРА

- Filazi A., Yurdakok-Dikmen B. Chapter 41 - Amitraz // Veterinary Toxicology 3rd ed. Basic and Clinical Principles ed. by R. C. Gupta. Academic Press, 2018. P. 525-531.
- 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. V. 1072. P. 60-69.
- 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. Sci. 2009. V. 32, № 23-24. P. 4020-4024.

4. Teratogenic effects of amitraz, 2,4-dimethylaniline, and paraquat on developing frog (*Xenopus*) embryos / O. Osano [et al.] // *Arch. Environ. Con. Tox.* 2002. V. 43. P. 42-49.
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. V. 1216, № 15. P. 3138-3146.
6. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS / E Corta. [et al.] // *Talanta.* 1999. V. 48, № 1. P. 189-199.
7. Solvent and surfactant enhanced solubilization, stabilization, and degradation of amitraz / C. M. van Eeden [et al.] // *J. Environ. Sci. Health. B.* 2004. V. B39, № 1. P. 33-51.
8. ГН от 21.06.2013 № 52. Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов. // Сборник нормативных документов по продовольственному сырью и пищевым продуктам. Минск, 2014. С. 235
9. ТР ТС 021/2011. О безопасности пищевой продукции // Совет Евраз. экон. комис. 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. № L 15. P. 1-72.
11. 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. V. 166. P. 240-247.
12. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS / Y. Ohba [et al.] // *Food Addit. Contam. A.* 2018. V. 35, № 12. P. 2375-2386.
13. 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. V. 1435. P. 100-114.
14. ГОСТ 34889-2022. Мёд натуральный. Определение массовой доли инсектицидов методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Минск: Евраз. совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2022. 11 с.
15. 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. V. 1052. P. 27-33.
16. 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.* 2014. V. 951952. P. 89-95.
17. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography-mass spectrometry / M. Caldow [et al.] // *Food Addit. Contam.* 2007. V. 24, № 3. P. 280-284.
18. 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.] // *J. Chromatogr. B.* 2010. V. 878, № 21. P. 17461752.
19. 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. V. 524, № 1-2. P. 271-278.
20. Разработка и валидация методики определения амиотраза в мёде высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием / А. Г. Полоневич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* 2022. Т. 58, № 4. С. 387-397.
21. Экстракция амиотраза и его метаболитов органическими растворителями / А. Г. Полоневич [и др.] // *Вес. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. хим. наук.* 2023. Т. 59, № 2. С. 139-149.
22. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. [Электронный ресурс]: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>. (дата обращения 05.06.2023).
23. СТБ ISO 11095-2009. Калибровка линейная с использованием стандартных образцов. Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2009. 31 с.
24. СТБ ISO 5725-2-2022. Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений. Часть 2. Основной метод определения повторяемости и воспроизводимости стандартного метода измерений. Минск : Госстандарт, 2022. 61 с.
25. *Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Nordtest Technical Report 537, 2017.* [Электронный ресурс]: [http://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT\\_TR\\_537\\_edition4\\_English\\_Handbook\\_for\\_calculation\\_of\\_measurement\\_uncertainty\\_in\\_environmental\\_laboratories.pdf](http://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT_TR_537_edition4_English_Handbook_for_calculation_of_measurement_uncertainty_in_environmental_laboratories.pdf). (дата обращения 05.06.2023).
26. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE/12682/2019. [Электронный ресурс]: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf). (дата обращения 05.06.2023).
27. Treatment of an observed bias (information leaflet) [Электронный ресурс]: [https://www.eurachem.org/images/stories/leaflets/mu/bias\\_01/Eurachem\\_Bias\\_Leaflet\\_01\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/leaflets/mu/bias_01/Eurachem_Bias_Leaflet_01_EN.pdf). (дата обращения 05.06.2023).

## REFERENCES

1. Filazi A., Yurdakok-Dikmen B. Chapter 41 - Amitraz. *Veterinary Toxicology 3rd ed. Basic and Clinical Principles ed. by R. C. Gupta.* Academic Press, 2018. pp. 525-531. doi: 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, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. *J. Chromatogr. B.* 2018, vol. 1072, pp. 60-69. doi: 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. *J. Sep. Sci.*, 2009, vol. 32, no. 23-24, pp. 4020-4024. doi: 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. *Arch. Environ. Con. Tox.*, 2002, vol. 43, pp. 42-49. doi: 10.1007/s00244-002-1132-4.
5. Nilgun Tokman, Carla Soler, Marinela Farré, Yolanda Picó, Damià Barceló. Determination of amitraz and its transformation products in pears by ethyl acetate extraction

- and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2009, vol. 1216, no. 15, pp. 3138–3146. doi: 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, no. 1, pp. 189–199. doi: 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. *J. Environ. Sci. Heal. B*, 2004, vol. B39, no. 1, pp. 33–51. doi: 10.1081/PFC-120027437.
  8. GN 06/21/2013 No. 52. [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.]. *Sbornik normativnykh dokumentov po prodovol'stvennomu syr'iu i pishchevym produktam* [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. *Off. J. of the European Union*, 2010, no. L15, pp. 1–72. doi: org/10.3000/17252555.L\_2010.015.eng.
  11. Hepperle J., Mack D., Sigalov I., Schöler, 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 Chem.*, 2015, vol. 166, pp. 240–247. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.06.003.
  12. 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 Addit. Contam. A*, 2018, vol. 35, no. 12, pp. 2375–2386. doi: org/10.1080/19440049.2018.1539252.
  13. Kiljanek T., Niewiadowska A., Semeniuk S., Gawel M., Borzęcka M., Posyniak 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. *J. Chromatogr. A*, 2016, vol. 1435, pp. 100–114. doi: 10.1016/j.chroma.2016.01.045.
  14. GOST 34889-2022. *Med natural'nyi. Opređenje massovoi doli insektitsidov metodom gazovoi khromatografii s mass-spektrometricheskim detektirovaniem* [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).
  15. 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. *J. Chromatogr. B*, 2017, vol. 1052, pp. 27–33. doi: 10.1016/j.jchromb.2017.03.004.
  16. 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. *J. Chromatogr. B*, 2014, vol. 951–952, pp. 89–95. doi: 10.1016/j.jchromb.2014.01.027.
  17. Caldwell M., Fussell R. J., Smith F., Sharman M. Development and validation of an analytical method for total amitraz in fruit and honey with quantification by gas chromatography–mass spectrometry. *Food Addit. Contam.*, 2007, vol. 24, no. 3, pp. 280–284. doi: 10.1080/02652030601013638.
  18. 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. *J. Chromatogr. B*, 2010, vol. 878, no. 21, pp. 1746–1752. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.04.034>.
  19. 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. *Anal. Chim. Acta*, 2004, vol. 524, no.1–2, pp. 271–278. doi: 10.1016/j.aca.2004.03.039.
  20. 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]. *Vestsi Natsyyanal'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. doi: 10.29235/1561-8331-2022-58-4-387-397. (in Russian).
  21. Polonevich A. G., Leschev S. M., Bulhakava V. A., Belyshava L. L. [Extraction of amitraz and its metabolites with organic solvents]. *Vestsi Natsyyanal'nai akademii navuk Belarusi. Seryya khimichnykh navuk* [Proceedings of the National Academy of Science of Belarus. *Chemical series*], 2023, vol. 59, no. 1, pp. 139–149. doi: 10.29235/1561-8331-2023-59-2-139-149. (in Russian).
  22. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf>.
  23. STB ISO 11095-2009. *Kalibrovka lineinaiia s ispol'zovaniem standartnykh obraztsov* [STB ISO 11095-2009. *Linear calibration using reference materials*]. Minsk, Belarusian state Institute of Standardization and Certification, 2009. 31 p. (in Russian).
  24. STB ISO 5725-2-2022. *Tochnost' (pravil'nost' i pretsizionnost') metodov i rezul'tatov izmerenii. Chast' 2. Osnovnoi metod opredeleniia povtoriaemosti i vosproizvodimosti standartnogo metoda izmerenii* [STB ISO 5725-2-2022. *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results. Part 2. Basic method for the determination of repeatability and reproducibility of a standard measurement method*]. Minsk, Gosstandart, 2022. 61 p. (in Russian).
  25. *Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories*. Nordtest Technical Report 537, 2017. Available at: [http://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT\\_TR\\_537\\_edition4\\_English\\_Handbook\\_for\\_calculation\\_of\\_measurement\\_uncertainty\\_in\\_environmental\\_laboratories.pdf](http://nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/NT_TR_537_edition4_English_Handbook_for_calculation_of_measurement_uncertainty_in_environmental_laboratories.pdf)
  26. *Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE/12682/2019*. Available at: [https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance\\_SANTE\\_2019\\_12682.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf).
  27. *Treatment of an observed bias (information leaflet)*. Available at: [https://www.eurachem.org/images/stories/leaflets/mu/bias\\_01/Eurachem\\_Bias\\_Leaflet\\_01\\_EN.pdf](https://www.eurachem.org/images/stories/leaflets/mu/bias_01/Eurachem_Bias_Leaflet_01_EN.pdf).