

**АНАЛІТЫЧНАЯ ХІМІЯ**  
**ANALYTICAL CHEMISTRY**УДК 615.285:542.61:543.544.5.068.7:543.51  
<https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-387-397>Поступила в редакцию 25.08.2022  
Received 25.08.2022**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, Беларусь<sup>2</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь**РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АМИТРАЗА В МЕДЕ  
ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИЕЙ  
С МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКИМ ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ**

**Аннотация.** Разработана и валидирована селективная, экспрессная, простая в исполнении методика определения остаточного содержания инсектицида амитраз в меде. Методика основана на экстрагировании амитраза из подщелаченного водного раствора меда *n*-гексаном и количественном определении методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Валидацию проводили с использованием трех видов меда на трех уровнях внесения амитраза 6, 120 и 220 мкг/кг. Предел определения составил 0,9 мкг/кг, градуировочные графики линейны в диапазоне концентраций от 2,5 до 125,0 нг/мл (соответствующее содержание аналита в меде – от 5,0 до 250,0 мкг/кг), относительные значения стандартного отклонения повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости не превысили 3,4 и 5,9 % соответственно, величины смещения изменялись от –8,2 до 5,6 %, оценки расширенной неопределенности результатов составили от 12 до 16 % ( $P = 0,95$ ). Также в процессе валидации были оценены инструментальный предел определения, общая эффективность процесса и устойчивость метода.

**Ключевые слова:** амитраз, жидкость-жидкостная экстракция, валидация методики, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрия

**Для цитирования.** Разработка и валидация методики определения амитраза в меде высокоэффективной жидкостной хроматографией с масс-спектрометрическим детектированием / А. Г. Полоневич [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. хім. навук. – 2022. – Т. 58, № 4. – С. 387–397. <https://doi.org/10.29235/1561-8331-2022-58-4-387-397>

**A. G. Polonevich<sup>1</sup>, S. M. Leshev<sup>2</sup>, V. A. Bulhakava<sup>1</sup>, L. L. Belyshava<sup>1</sup>**<sup>1</sup>Scientific Practical Center of Hygiene, Minsk, Belarus<sup>2</sup>Belarusian State University, Minsk, Belarus**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF THE METHOD FOR DETERMINATION  
OF AMITRAZ IN HONEY USING HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY  
WITH MASS SPECTROMETRIC DETECTION**

**Abstract.** Method for determination of the insecticide amitraz residual content in honey has been developed and validated. The method is selective, express and easy-to-perform. The technique is based on the extraction of amitraz from alkalinized aqueous solutions of honey with *n*-hexane and quantitative determination by high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. Validation was performed using three types of honey at three levels of amitraz application 6, 120 and 220 µg/kg. The limit of quantification was 0.9 µg/kg, the calibration curves were linear in the concentration range from 2.5 to 125.0 ng/mL (the corresponding analyte content in honey is from 5.0 to 250.0 µg/kg), relative values of the standard deviations of repeatability and within-laboratory reproducibility did not exceed 3.4 and 5.9 %, respectively, the bias values varied from –8.2 to 5.6 %, the expanded uncertainty estimates of the results ranged from 12 to 16 % ( $P = 0.95$ ). Instrumental limit of quantification, overall efficiency of the process and robustness were also evaluated during the validation process.

**Keywords:** amitraz, liquid-liquid extraction, method validation, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry

**For citation.** Polonevich A. G., Leshev 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'noi akademii navuk Belarusi. Seriya 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>

**Введение.** Амитраз, инсектицид и акарицид широкого спектра действия повсеместно используют в сельском хозяйстве и ветеринарии [1]. В пчеловодстве данным препаратом обрабатывают ульи для защиты от паразитических клещей *Varroa*, которые вызывают у пчел заболевание варроатоз [2]. Такая практика может приводить к загрязнению меда. Амитраз, попадая в организм человека, оказывает токсическое воздействие: могут наблюдаться низкое кровяное давление, гипотермия, летаргия, анорексия, атаксия, судороги, мидриаз, рвота, высокий уровень глюкозы в крови и расстройства пищеварительного тракта, нарушение репродуктивной системы [1]. Для контроля безопасности меда установлен максимально допустимый уровень остаточного содержания амитраза – 200 мкг/кг [3]. Для рутинного контроля продукции необходимы методы, включающие быструю, нетрудоемкую и эффективную пробоподготовку. Наиболее распространенной реализацией данного подхода является метод QuEChERS («Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe») в сочетании с методами масс-спектрометрии [2, 4–6]. Однако QuEChERS является «быстрым» лишь при использовании готовых наборов, в отсутствие которых необходимо затратить много времени на подготовку к анализу взвешивая соли и сорбенты для каждого образца. Помимо этого, реализация метода QuEChERS предполагает использование дорогостоящих реактивов (PSA (primary secondary amine, смесь первичных и вторичных аминов), безводного сульфата магния).

Таким образом, разработка удобного в исполнении и доступного для рутинных исследований метода определения амитраза в меде является актуальной задачей, для достижения которой целесообразно использовать простую в реализации жидкость-жидкостную экстракцию. Поскольку неполярный амитраз крайне мало растворим в воде и хорошо в органических растворителях [7, 8], он может быть селективно извлечен *n*-гексаном из водных растворов меда. С учетом нестабильности амитраза в водных растворах с низкими значениями pH [9] мед необходимо изначально растворять в растворах со щелочным pH. Подходящим для поддержания необходимого уровня pH является аммиак, поскольку он летуч и не приводит к загрязнению интерфейса ионизации масс-спектрометра даже в случае «захвата» водной фазы при отборе органического слоя.

Цель – разработать и валидировать экспрессную, селективную и доступную методику определения амитраза в меде с использованием жидкость-жидкостной экстракции для извлечения аналита и метода ВЭЖХ–МС/МС (высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией) для его инструментального определения.

**Материалы и методы.** В качестве стандартных образцов использовали амитраз (рис. 1) 99,8 мас.% производства фирмы Sigma-Aldrich (США) и амитраз-D<sub>3</sub> 99,5 мас.% производства фирмы Witega (Германия). Структурная формула амитраза представлена на рис. 1.

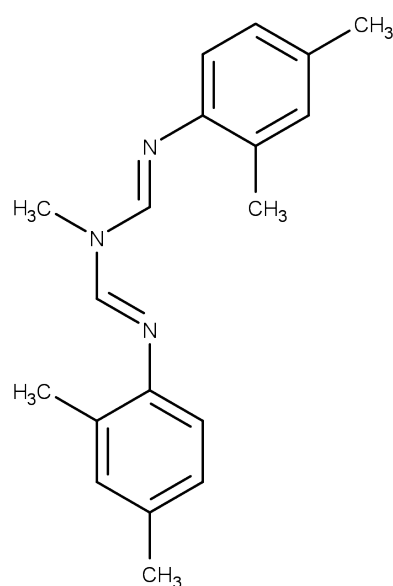


Рис. 1. Структурная формула амитраза  
Fig. 1. Structural formula of amitraz

Применяли *n*-гексан для ВЭЖХ ( $\geq 96\%$ , Carlo Erba, Франция); ацетонитрил для ВЭЖХ ( $\geq 99,9\%$ , Carlo Erba, Франция), муравьиную кислоту (98%, Acros Organics, Бельгия), аммиак водный ч. д. а. (АО «База № 1 Химреактивов», Россия). Деионизированную воду получали с помощью системы очистки воды Easy pure II RF/UV (Thermo Scientific, США). Образцы меда с частных пасек (гречишный, цветочный, разнотравье), не содержащие амитраз, которые были предварительно проанализированы для подтверждения отсутствия в них остатков инсектицида.

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) и диаметром 13 мм (Macherey-Nagel, Германия).

Количественное определение амитраза 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 обращенно-фазовую колонку Zorbax SB C18 длиной 150 мм, внутренним диаметром 2,1 мм, с зернением сорбента 3,5 мкм (Agilent Technologies, США). Компонентами подвижной фазы являлись: 0,1 %-ный раствор муравьиной кислоты в воде (А) и ацетонитрил (В). Режим градиентного элюирования: от 0 до 0,3 мин – 50 об.% В, от 0,3 до 0,8 мин – от 50 до 95 об.% В, от 0,8 до 7,0 мин – 95 об.% В, от 7,0 до 7,1 мин – от 95 до 50 об.% В, от 7,1 до 13,0 мин – 50 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 и амитраза-D<sub>3</sub> в режиме MRM (значения *m/z* родительских и дочерних ионов, соответствующие значения энергии соударений) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Параметры воздействия на ионы амитраза и амитраза-D<sub>3</sub> в режиме MRM  
Table 1. Parameters of exposure on amitraz 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	13
	294	122	34
	294	107	50
Амитраз-D <sub>3</sub>	297	166	14

**Подготовка образцов меда.** К навеске меда массой 1,0 г, взвешенной в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см<sup>3</sup>, вносили аликвоту раствора амитраза-D<sub>3</sub> в качестве внутреннего стандарта. Затем приливали 5 см<sup>3</sup> водного раствора аммиака одной из концентраций – 90, 100 либо 100 мМ – и перемешивали с помощью электровстряхивателя до растворения меда. Добавляли 5 см<sup>3</sup> *n*-гексана и встряхивали в течение 3, 4 и 5 мин. Далее пробы центрифугировали в течение 4 мин при 7000–10000 об/мин и 5–15 °С. Отбирали органический слой в чистую пробирку. Для части проб проводили экстрагирование амитраза второй порцией *n*-гексана объемом 4 мл и получали объединенный экстракт. Органический экстракт упаривали в токе азота при 30–35 °С с использованием системы упаривания растворителей до влажного сухого остатка. Остаток растворяли при перемешивании в течение 5 мин в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила, приливали 1 см<sup>3</sup> 100 мМ водного раствора аммиака, перемешивали в течение 2–3 мин.

При проведении валидации методики оценивали селективность, инструментальный предел определения, матричный эффект, общую эффективность процесса, предел определения, градуировочные графики (линейность), устойчивость методики, повторяемость, внутрилабораторную воспроизводимость, смещение, неопределенность результатов.

Для проверки селективности метода проводили анализ трех образцов меда. На полученных хроматограммах проверяли наличие сигналов, которые потенциально могли бы исказить пики дочерних ионов амитраза и его дейтерированной формы.

Инструментальный предел определения *iLOQ* оценивали для каждого из дочерних ионов амитраза согласно [10] по формуле:

$$iLOQ = 10 \frac{s_0}{b}, \quad (1)$$

где  $s_0$  – стандартное отклонение остатков градуировочного графика, усл. ед.;  $b$  – коэффициент регрессии градуировочного графика, усл. ед. (нг/мл)<sup>-1</sup>. Для расчета  $s_0$  и  $b$  строили градуировочные графики в диапазоне концентраций, охватывающем ожидаемые величины предела.

Для оценивания матричного эффекта *ME* и общей эффективности процесса *PE* (включает абсолютную степень извлечения и матричный эффект) использовали растворы амитраза одинаковых приписанных концентраций: растворы в чистом растворителе (solvent standard); матричные растворы, полученные внесением амитраза к навеске чистой пробы меда перед началом экстрагирования (pre-extraction standard); матричные растворы, полученные внесением амитраза к навеске чистой пробы меда после завершения пробоподготовки (post-extraction standard).

Оценки  $PE$  и  $ME$  получали тремя способами:

1) через сравнение значений углов наклона соответствующих градуировочных графиков  $b$ :

$$ME = \frac{b_{post-extraction\ standard}}{b_{solvent\ standard}} 100, \quad (2)$$

$$PE = \frac{b_{pre-extraction\ standard}}{b_{solvent\ standard}} 100; \quad (3)$$

2) посредством сравнения рассчитанных концентраций  $C$ :

$$ME = \frac{C_{post-extraction\ standard}}{C_{solvent\ standard}} 100, \quad (4)$$

$$PE = \frac{C_{pre-extraction\ standard}}{C_{solvent\ standard}} 100; \quad (5)$$

3) на основании сравнения площадей хроматографических пиков  $S$ :

$$ME = \frac{S_{post-extraction\ standard}}{S_{solvent\ standard}} 100, \quad (6)$$

$$PE = \frac{S_{pre-extraction\ standard}}{S_{solvent\ standard}} 100. \quad (7)$$

Поскольку величины  $PE$  и  $ME$  могут быть различными для разного уровня содержания аналита в пробе, готовили растворы амитраза следующих концентраций: растворы в смеси ацетонитрил – 100 мМ водный раствор аммиака концентрациями 2,5; 5,0; 12,5; 40,0; 70,0; 95,0 и 125,0 нг/мл (solvent standards) и матричные растворы с такими же приписанными концентрациями амитраза в итоговых растворах, которые соответствуют содержанию амитраза в меде 5,0; 10,0; 25,0; 80,0; 140,0; 190,0 и 250,0 мкг/кг (pre-extraction standards и post-extraction standards). Каждый раствор, приготовленный в двух параллелях, содержал также амитраз- $D_3$  с одинаковыми приписанными концентрациями.

Предел определения  $LOQ$  амитраза в меде оценили на основании полученных значений инструментального предела определения и общей эффективности процесса:

$$LOQ = iLOQ \frac{100}{PE}. \quad (8)$$

Градуировочные растворы амитраза готовили в смеси ацетонитрил – 100 мМ водный раствор аммиака концентрациями 2,5; 5,0; 12,5; 40,0; 70,0; 95,0 и 125,0 нг/мл (соответствуют массовой доле амитраза в меде 5,0; 10,0; 25,0; 80,0; 140,0; 190,0 и 250,0 мкг/кг). Строили градуировочные графики в различных диапазонах: от 5 до 250 мкг/кг, от 5 до 140 мкг/кг, от 5 до 80 мкг/кг, от 5 до 25 мкг/кг и от 25 до 250 мкг/кг. Устанавливали зависимость относительной площади пика  $y$  (отношение площадей пиков амитраза и амитраза- $D_3$ ) от соответствующей относительной концентрации  $x$  (отношение концентрации амитраза к концентрации амитраза- $D_3$ ). Рассчитывали коэффициенты регрессии для зависимостей типа  $y = a + bx$  и типа  $y = bx$  при установлении незначимого отличия от нуля свободного коэффициента регрессии  $a$ . Линейность проверяли путем сравнения дисперсий «неадекватной аппроксимации»  $MSSL$  и «случайности»  $MSSP$  с помощью критерия Фишера  $F_{lack} = MSSL/MSSP$  [11]. Рассчитывали также значения коэффициента детерминации  $R^2$ . Оценивание градуировочных графиков проводили для каждой серии исследований.

Проверку устойчивости методики к изменению концентрации водного раствора аммиака и продолжительности экстрагирования, а также к количеству экстракций проводили сравнивая средние значения результатов, полученных в заданных условиях, с помощью критерия Стьюдента. 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  $f = 4$ :  $t_{crit} = 2,8$ . Значение  $t < t_{crit}$  свидетельствовало о том, что изменение фактора не значительно влияет на получаемые результаты, значение  $t \geq t_{crit}$  – о том, что влияние значимо.

Повторяемость, внутрилабораторная воспроизводимость и смещение изучали с использованием трех образцов меда ( $p = 3$ ). В каждый из образцов вносили стандарт амитраза из расчета его содержания в меде  $\gamma = 6, 120$  и  $220$  мкг/кг соответственно и стандарт амитраза- $D_3$  на уровне содержания  $200$  мкг/кг. Для каждого  $k$ -го ( $k = \overline{1, p}$ ) образца меда на каждом уровне было проведено по  $6$  определений ( $n_k = 6$ ).

Содержания амитраза на уровне внесения  $6$  мкг/кг рассчитывали по градуировочным графикам в диапазоне от  $5$  до  $25$  мкг/кг, на уровне  $120$  мкг/кг – от  $25$  до  $250$  мкг/кг, на уровне  $220$  мкг/кг – от  $25$  до  $250$  мкг/кг.

Результаты на каждом уровне внесения для каждого образца меда проверяли на выбросы по критерию Граббса: все результаты были корректными ( $n_k = n = 6$ ). В качестве оценок стандартного отклонения повторяемости  $s_r$  использовали средневзвешенные стандартные отклонения, рассчитанные на основании значений, полученных для каждого образца меда  $s_k$ :

$$s_k = \sqrt{\frac{1}{n_k - 1} \sum_{i=1}^{n_k} (x_{ki} - \bar{x}_k)^2}, \quad (9)$$

$$s_r = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p s_k^2}. \quad (10)$$

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

$$s_{RW} = \sqrt{s_r^2 + s_L^2}, \quad (11)$$

где

$$s_L^2 = \frac{s_d^2 - s_r^2}{n}, \quad (12)$$

$$s_d^2 = \frac{1}{p-1} \sum_{k=1}^p n(\bar{x}_k - \bar{x})^2, \quad (13)$$

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

Правильность количественно оценивали по величине смещения  $bias_k$ , которое строго не равноценно ни  $(1 - R)$ , ни  $(1 - PE)$  поскольку для количественного определения использовали метод внутреннего стандарта

$$bias_k = \bar{x}_k - \gamma. \quad (14)$$

Для установления значимости отличия  $bias_k$  от  $0$  применяли статистический критерий  $t$ :

$$t = \frac{|bias_k|}{\sqrt{\frac{s_{rk}^2}{n_k} + u(\gamma)^2}}, \quad (15)$$

где  $u(\gamma)$  – неопределенность приписанного значения содержания амитраза в пробах с внесением, 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  $f = n_k - 1$ :  $t_{crit} = 2,6$ . 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 [12] на основании оценок неопределенности, связанной со случайными факторами – стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости  $s_{RW}$ , и неопределенности, обусловленной возможным смещением  $u(bias)$ :

$$u_c = \sqrt{s_{RW}^2 + u(bias)^2}. \quad (16)$$



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

$$u(bias) = \sqrt{RMS_{bias}^2 + u(\gamma)^2}, \quad (17)$$

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

$$RMS_{bias} = \sqrt{\frac{1}{p} \sum_{k=1}^p bias_k^2}, \quad (18)$$

$$bias_k = \bar{x}_k - \gamma. \quad (19)$$

Величину расширенной неопределенности  $U$  ( $P = 95\%$ ,  $k = 2$ ) рассчитывали по формуле:

$$U = 2u_c. \quad (20)$$

**Результаты и их обсуждение.** Предварительно косвенно экспериментально установлено, что степень извлечения амитраза *n*-гексаном из водной фазы составляет более 99,9 %. Оценка получена через определение растворимости аналита в *n*-гексане. Так было показано, что данный растворитель является наиболее селективным, оптимальным экстрагентом, поскольку одновременно обеспечивает достаточную эффективность извлечения амитраза и отделение компонентов матрицы меда (сахара, белки и аминокислоты, минеральные вещества). Получаемые экстракты нет необходимости подвергать дополнительной очистке. Таким образом, использование других, более полярных, чем *n*-гексан, растворителей нецелесообразно.

Для достижения высокой селективности метода количественное определение амитраза проводили по основному наиболее интенсивному дочернему иону ( $m/z$  163) при условии подтверждения идентификации по двум другим дочерним ионам ( $m/z$  122 и 107). Также необходимым условием идентификации являлось соответствие времени удерживания в образцах времени, установленному по градуировочным растворам. Так, среднее время удерживания амитраза и амитраза-D<sub>3</sub>, полученное при анализе градуировочных растворов, составило 5,78 и 5,74 мин соответственно. Хроматограммы, полученные для градуировочного раствора амитраза концентрацией 2,5 нг/мл, представлены на рис. 2.

Время удерживания в образцах не отклонялось относительно установленного более чем на 0,02 мин, что соответствует допустимому отклонению, равному  $\pm 0,1$  мин, согласно рекомендации [13]. Свидетельством того что разработанный метод селективный, явилось отсутствие на хроматограммах, полученных для образцов трех видов меда, сигналов, превышающих уровень шума вблизи времени удерживания амитраза. Полученные хроматограммы для гречишного меда представлены на рис. 3.

Оценка инструментального предела определения *iLOQ* амитраза для регистрации основного перехода 294→163 составила 0,03 нг/мл, перехода 294→122 – 0,33 нг/мл, перехода 294→107 – 0,04 нг/мл. При этом величина отношения сигнал/шум ( $S/N$ ) составляла не менее 10 при более низких концентрациях амитраза: для перехода 294→163, начиная с концентрации 0,0125 нг/мл, для переходов 294→122 и 294→107 – с 0,0250 нг/мл. Величину *iLOQ* приняли равной 0,33 нг/мл как наибольшей из всех полученных оценок. Данные значения оценок величины матричного эффекта *ME*, рассчитанные тремя способами, приведены табл. 2.

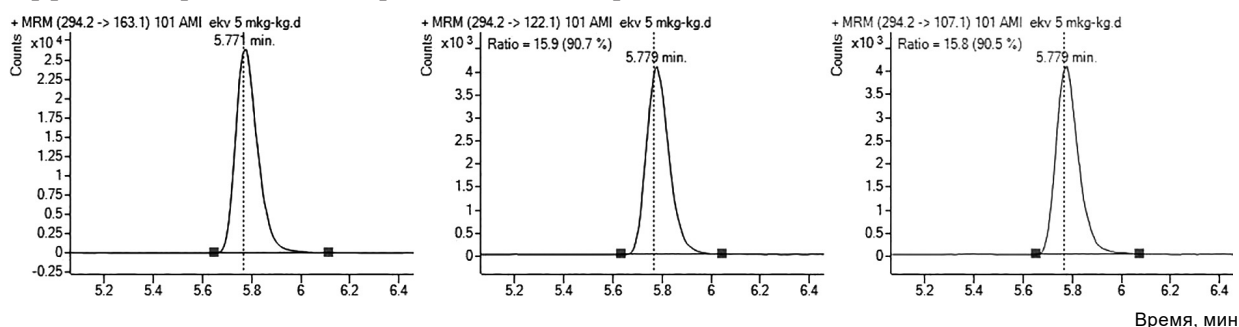


Рис. 2. Хроматограмма раствора амитраза концентрацией 2,5 нг/мл

Fig. 2. Chromatogram of amitraz solution with the concentration of 2,5 ng/ml

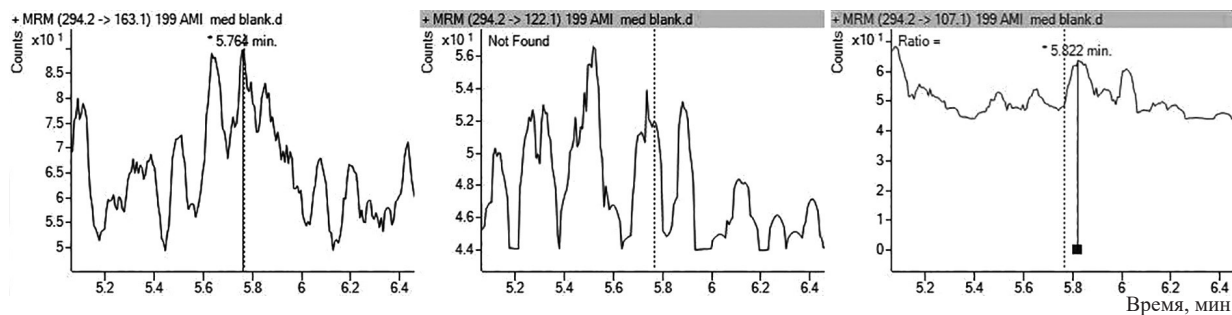


Рис. 3. Хроматограмма образца гречишного меда  
 Fig. 3. Chromatogram of the buckwheat honey sample

Т а б л и ц а 2. Оценки величины матричного эффекта  
 T a b l e 2. Estimates of the matrix effect magnitude

Концентрация амитраза в растворе, нг/мл	Массовая доля амитраза в меде, мкг/кг	ME, %		
		сравнение значений углов наклона градуировочных графиков	сравнение рассчитанных концентраций	сравнение площадей хроматографических пиков
2,5	5,0	98	100	102
5,0	10,0		97	99
12,5	25,0		98	97
40,0	80,0	100	100	101
70,0	140,0		97	94
95,0	190,0		98	99
125,0	250,0		100	100

Как видно из табл. 2, оценки, полученные через сравнения углов наклона градуировочных графиков, составили 98 и 100 %. Среднее арифметическое оценок, рассчитанных по величинам концентрации, составило 99 % со стандартным отклонением 1 %. Среднее арифметическое значений, рассчитанных по площадям хроматографических пиков, составило 99 % со стандартным отклонением 3 %. Таким образом, оценки матричного эффекта, полученные тремя различными подходами, близки, зависимости их величин от концентрации не наблюдали. Средняя величина эффективности процесса для дейтерированной формы аналита составила 101 %, стандартное отклонение – 3 %. Значительного матричного эффекта не зафиксировано. Рассчитанные оценки величины эффективности процесса PE приведены табл. 3.

Из данных табл. 3 видно, что оценки эффективности процесса, полученные сравнением углов наклона градуировочных графиков, составили 86 и 81 %. Среднее арифметическое оценок, рассчитанных по величинам концентрации, составило 79 % (стандартное отклонение 3 %). Среднее арифметическое значений, рассчитанных по площадям хроматографических пиков, – 81 % (стандартное отклонение 2 %). Оценки эффективности процесса, полученные с помощью трех подходов, близки, зависимости их величин от концентрации не зафиксировано. Средняя величина эффективности процесса для амитраза-D<sub>3</sub> составила 81 %, стандартное отклонение – 1 %. Средние оценки PE по хроматографическим пикам амитраза и амитраза-D<sub>3</sub> равны, что дает возможность количественного определения амитраза в меде методом внутреннего стандарта с использованием внешней калибровки без применения матричных градуировочных растворов.

Значения предела определения амитраза в меде LOQ, рассчитанные на основании оценок iLOQ и PE, составили 0,41 нг/мл (по среднему PE = 81 %) и 0,44 нг/мл (по наименьшему полученному значению PE = 75 %), что соответствует массовой доли амитраза в меде 0,8 и 0,9 мкг/кг соответственно. Результаты анализа градуировочных графиков представлены в табл. 4.

Данные табл. 4 показывают, что в большинстве случаев коэффициент a не значим (a = 0). Согласно результатам проверки линейности по критерию Фишера, для всех графиков не было оснований признавать непригодной линейную модель. Значения коэффициента детерминации

Т а б л и ц а 3. Оценки величины эффективности процесса

T a b l e 3. Estimates of the process efficiency magnitude

Концентрация амитраза в растворе, нг/мл	Массовая доля амитраза в меде, мкг/кг	PE, %		
		сравнение значений углов наклона градуировочных графиков	сравнение рассчитанных концентраций	сравнение площадей хроматографических пиков
2,5	5,0	86	76	79
5,0	10,0		79	81
12,5	25,0		84	83
40,0	80,0	81	75	81
70,0	140,0		81	83
95,0	190,0		78	77
125,0	250,0		80	82

Т а б л и ц а 4. Результаты анализа градуировочных графиков

T a b l e 4. Results of the analysis of calibration curves

Номер серии	Диапазон концентраций, нг/мл	Количество градуировочных уровней	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>R</i> <sup>2</sup>	Линейность
1	2,5–125	7	0	0,8511	0,999	Линейный
2	2,5–125	7	0	0,8508	0,999	
3	2,5–125	7	0	0,8544	0,999	
1	2,5–70	5	0	0,8704	0,999	Линейный
2	2,5–70	5	0	0,8287	0,999	
3	2,5–70	5	0	0,8466	1,000	
1	2,5–40	4	0	0,8887	0,998	Линейный
2	2,5–40	4	0	0,8014	1,000	
3	2,5–40	4	0	0,8580	0,999	
1	2,5–12,5	3	–0,003	0,8445	0,999	Линейный
2	2,5–12,5	3	0	0,7966	0,998	
3	2,5–12,5	3	–0,002	0,8436	0,999	
1	12,5–125	5	0	0,8512	0,999	Линейный
2	12,5–125	5	0	0,8509	0,999	
3	12,5–125	5	0	0,8545	0,999	

$R^2$  составили от 0,998 до 1,000. Обратные рассчитанные по полученным графикам концентрации всех градуировочных растворов не отклонялись от приписанных значений более чем на 15 %. Таким образом, все графики пригодны для количественного определения, в том числе график, построенный в широком диапазоне концентраций от 2,5 до 125 нг/мл. Тем не менее с целью снижения неопределенности получаемых результатов предпочтительней использовать график в более узком диапазоне, охватывающем содержание амитраза в образце, полученном по не менее чем трем точкам. Результаты расчета *t*-критерия для проверки устойчивости методики приведены в табл. 5.

Согласно табл. 5 ( $t_{crit} = 2,8$ ), методика устойчива к изменению концентрации аммиака в растворе для растворения меда в диапазоне от 90 до 110 мМ (значения *t* составили от 0,5 до 1,6) и к изменению продолжительности экстрагирования *n*-гексаном в диапазоне от 3 до 5 мин (значения *t* составили от 0,4 до 1,2). Уменьшение количества экстракций характеризовалось значениями *t*-критерия ниже критического для уровней внесения 120 и 220 мкг/кг (0,7 и 1,6 соответственно), на уровне внесения 6 мкг/кг критерий  $t = t_{crit} = 2,8$ , что давало возможность сделать заключение



Т а б л и ц а 5. Результаты расчета *t*-критерия для проверки устойчивости метода

Table 5. The results of the *t*-criterion calculation for the method robustness test

Фактор	Уровень внесения амитраза, мкг/кг	Разница средних, мкг/кг	Стандартная ошибка SE, мкг/кг	<i>t</i>
Время экстрагирования	6	0,27	0,17	1,6
	120	2,59	2,28	1,1
	220	4,32	8,01	0,5
Концентрация аммиака	6	0,13	0,11	1,2
	120	1,55	4,43	0,4
	220	6,56	6,65	1,0
Количество экстракций	6	0,15	0,05	2,8
	120	2,57	3,54	0,7
	220	5,08	3,21	1,6

о значимом влиянии количества экстракций на получаемые результаты. Однако, поскольку разница между средними, полученными при разном количестве экстракций, значительно ниже оцененной расширенной неопределенности результатов, а также учитывая, что результаты, полученные с использованием одностадийного экстрагирования, учли при расчете неопределенности измерений, приняли решение о приемлемости однократного экстрагирования амитраза.

Полученные относительные значения смещения  $bias_k$  для каждого уровня внесения по каждому образцу меда и результаты проверки значимости смещения представлены в табл. 6.

Т а б л и ц а 6. Относительные значения смещения, проверка значимости смещения

Table 6. Relative bias values, bias significance checking

<i>k</i>	6 мкг/кг			120 мкг/кг			220 мкг/кг		
	<i>bias</i> , %	<i>t</i>	сравнение с $t_{crit}$	<i>bias</i> , %	<i>t</i>	сравнение с $t_{crit}$	<i>bias</i> , %	<i>t</i>	сравнение с $t_{crit}$
1	1,6	0,5	$t < t_{crit}$	3,9	1,5	$t < t_{crit}$	5,6	1,9	$t < t_{crit}$
2	-8,2	2,9	$t > t_{crit}$	-1,8	0,6	$t < t_{crit}$	2,5	0,8	$t < t_{crit}$
3	-0,6	0,2	$t < t_{crit}$	3,5	1,2	$t < t_{crit}$	4,5	1,7	$t < t_{crit}$

Оценки смещения изменялись в диапазоне от -8,2 до 5,6 %, что соответствует критерию [13]: средние значения смещения должны принадлежать интервалу от -30 до +20 %. На всех уровнях внесения с использованием каждого из трех видов меда величины смещения не значимо отличались от нуля, за исключением одной, полученной для второго образца меда с внесением амитраза на уровне 6 мкг/кг. Учитывая, что фактическое значение смещения (-8,2 %) вошло в расчет неопределенности измерений через  $RMS_{bias}$  и расширенная неопределенность практически в два раза превышает рассматриваемое значение смещение, то нет необходимости использовать поправочный коэффициент [14].

Результаты оценивания относительных значений стандартного отклонения повторяемости  $s_r$  и внутрилабораторной воспроизводимости  $s_{RW}$ , среднеквадратичного смещения  $RMS_{bias}$ , суммарной стандартной неопределенности  $u_c$  и расширенной неопределенности  $U$  приведены в табл. 7.

Т а б л и ц а 7. Результаты оценивания относительных значений стандартного отклонения повторяемости и внутрилабораторной воспроизводимости, среднеквадратичного смещения, неопределенности результатов

Table 7. The results of evaluating the relative values of the standard deviation of repeatability and within-laboratory reproducibility, the root mean square bias, the uncertainty of the results

Уровень, мкг/кг	$s_r$ , %	$s_{RW}$ , %	$RMS_{bias}$ , %	$u(\gamma)$ , %	$u(bias)$ , %	$u_c$ , %	$U$ , %
6	2,8	5,9	4,8	2,6	5,5	8,0	16
120	3,4	4,3	3,2	2,5	4,1	6,0	12
220	3,3	3,3	4,4	2,5	5,0	6,1	12

Значения стандартного отклонения повторяемости составили от 2,8 до 3,4 %, стандартного отклонения внутрилабораторной воспроизводимости – от 3,3 до 5,9 %, что удовлетворяет критерию [13]: величины  $s_r$  и  $s_{RW}$  не должны превышать 20 %.

Полученные оценки расширенной неопределенности результатов составили 12 % для уровней внесения 120 и 220 мкг/кг и 16 % для содержания амитраза на уровне 6 мкг/кг.

Таким образом, на основании проведенных исследований и статистической обработки полученных результатов разработали следующую методику определения амитраза в меде. К навеске меда массой 1,0 г, взвешенной в полипропиленовой пробирке вместимостью 15 см<sup>3</sup>, вносили аликвоту раствора амитраза-D<sub>3</sub> в качестве внутреннего из расчета его содержания в меде 200 мкг/кг. Приливали в 5 см<sup>3</sup> (90±10) мМ водного раствора аммиака и перемешивали с помощью электровстряхивателя до растворения меда. Затем к раствору меда приливали 5 см<sup>3</sup> *n*-гексана и встряхивали в течение 3±1 мин. Далее пробы центрифугировали в течение 4 мин при 7000–10000 об/мин при 5–15 °С. Отбирали органический слой в чистую пробирку и упаривали в токе азота при 30–35 °С с использованием системы упаривания растворителей до влажного сухого остатка. Остаток растворяли при перемешивании в течение 5 мин в 1 см<sup>3</sup> ацетонитрила, приливали 1 см<sup>3</sup> 100 мМ водного раствора аммиака и перемешивали в течение 2–3 мин. Полученный раствор фильтровали через мембранный шприцевой фильтр из регенерированной целлюлозы в виалу для исследования методом ВЭЖХ–МС/МС. Количественное определение проводили методом внутреннего стандарта с использованием внешней градуировки. Готовили градуировочные растворы в смеси ацетонитрил – 100 мМ водный раствор аммиака концентрациями амитраз 2,5; 5,0; 12,5; 40,0; 70,0; 95,0 и 125,0 нг/мл (соответствуют массовой доле амитраза в меде 5,0; 10,0; 25,0; 80,0; 140,0; 190,0 и 250,0 мкг/кг) и концентрацией дейтерированной формы амитраза 100 нг/мл (200 мкг/кг). Содержания амитраза в образце рассчитывали по графику, построенному по не менее чем трем уровням, охватывающим содержание амитраза в образце.

**Заключение.** Разработана селективная, экспрессная, простая в исполнении, приемлемая для рутинных исследований методика определения амитраза в меде, основанная на жидкость-жидкостной экстракции и количественном определении методом ВЭЖХ–МС/МС. Получаемые экстракты достаточно чистые и не требуют дополнительной очистки. Для реализации методики необходимы только широкодоступные реактивы и материалы. В процессе валидации методики оценены селективность, инструментальный предел определения, матричный эффект, общая эффективность процесса, предел определения, линейность, устойчивость методики, повторяемость, внутрилабораторную воспроизводимость, смещение, неопределенность результатов.

### Список использованных источников

1. 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, fluralanate, 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. О безопасности пищевой продукции: ТР ТС 021/2011: принят 09.12.2011 : вступ. в силу 01.07.2013 / Совет Евраз. экон. комис. – Минск : Энергопресс, 2021. – 144 с
4. 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>
5. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS / Y. Ohba [et al.] // Food Addit. Contam.: Part A. – 2018. – Vol. 35, iss. 12. – P. 2375–2386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539252>
6. 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>
7. Solvent and Surfactant Enhanced Solubilization, Stabilization, and Degradation of Amitraz / Ch. 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. 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>
9. 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)
10. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH), Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology [Electronic resource]. – Mode of access: [https://database.ich.org/sites/default/files/Q2\(R1\)%20Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2(R1)%20Guideline.pdf). – Date of access: 01.07.2022.
11. Калибровка линейная с использованием стандартных образцов: СТБ ISO 11095-2009. – Введ. 14.07.2009. – Минск : Белорус. гос. ин-т стандартизации и сертификации, 2009. – 31 с.

12. Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, Nordtest Technical Report 537, 2017 [Electronic resource]. – Mode of access: [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). – Date of access: 01.07.2022.
13. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed SANTE/12682/2019 [Electronic resource]. – Mode of access: [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). – Date of access: 01.07.2022.
14. Treatment of an observed bias (information leaflet) [Electronic resource]. – Mode of access: [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). – Date of access: 01.07.2022.

## References

- 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>
- 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*, vol. 1072, 2018, pp. 60–69. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2017.11.011>
- Council of the Eurasian Economic Commission. TR [Customs Union Technical Regulation] TS 021/2011. *On the Safety of Food Products*. Minsk, Energopress Publ., 2021. 144 p. (in Russian).
- Julia Hepperle, Dorothea Mack, Irina Sigalov, Sigrid Schütler, Michelangelo Anastassiades. 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*, vol. 166, 2015, pp. 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.003>
- Yumi Ohba, Takayuki Nakajima, Maki Kanda, Hiroshi Hayashi, Youko Matsushima, Yukiko Nakagawa, Hiroshi Koike, Chieko Nagano, Kotaro Sekimura, Kenji Otsuka, Takeo Sasamoto, Tsuneo Hashimoto. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 2018, vol. 35, iss. 12, pp. 2375–2386. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1539252>
- Tomasz Kiljanek, Alicja Niewiadowska, Stanisław Semeniuk, Marta Gaweł, Milena Borzęcka, Andrzej Posyniak. 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>
- 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, Part B*, 2004, vol. 39, no. 1, pp. 33–51. <https://doi.org/10.1081/PFC-120027437>
- Pablo R. Duchowicz, Alan Talevi, Luis E. Bruno-Blanch, Eduardo A. Castro. 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>
- 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)
- 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\(R1\)%20Guideline.pdf](https://database.ich.org/sites/default/files/Q2(R1)%20Guideline.pdf).
- STB ISO 11095-2009. *Linear calibration using reference materials*. Minsk, Belarusian state Institute of Standardization and Certification, 2009. 31 p. (in Russian).
- 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)
- 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)
- 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)

## Информация об авторах

Полоневич Анна Геннадьевна – 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)

Лещев 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

Polonevich Anna G. – 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)

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

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

Belysheva Liudmila L. – 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)