

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра хімії ліків та лікарської токсикології

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему

**«Визначення полярних нітрозамінів в лаках для нігтів медичного
та косметичного призначення»**

Виконала: здобувач вищої освіти 5 курсу,
групи 10801, фармацевтичного факультету
226 «Фармація, промислова фармація»

Литвиненко В.Ю.

Керівники: к.х.н. Сиротчук О.А.

к.х.н. доцент Глушаченко О.О.

Рецензент: к.х.н. Зайцева Г.М.

Київ-2025

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

NDMA – Нітрозодиметиламін;

NDEA – Нітрозодиетиламін;

FDA – Food and Drug Administration;

GC-MS/MS - Газова хромато-мас-спектрометрія;

LC-HRMS - Рідинна хроматографія з високороздільною мас-спектрометрією;

RP-HPLC - Високоєфективна рідинна хроматографія в оберненій фазі;

HPLC-MS/MS - Високоєфективна рідинна хроматографія у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією;

LC-MS/MS - Рідинна хроматографія у поєднанні з тандемною мас-спектрометрією;

ЗМІСТ

ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	11
1.1. Поняття нітрозамінів.....	11
1.1.1. Історія виявлення нітрозамінів.....	11
1.1.2. Джерела утворення нітрозамінів.....	13
1.1.3. Нітрозаміни в об'єкті дослідження.....	14
1.2. Фармакологія.....	15
1.2.1. Канцерогенні нітрозаміни в їжі, воді, ліках та косметиці.....	15
1.2.2. Метаболізм NDMA.....	16
1.2.3. Метаболізм NDEA.....	18
1.3. Ризик для людей.....	19
1.4. Допустима добова норма.....	20
1.5. Контроль за домішками.....	20
1.6. Методика визначення.....	21
1.6.1. GC-MS/MS.....	21
1.6.2. LC-HRMS.....	24
1.6.3. RP-HPLC.....	26
1.6.4. HPLC-MS/MS.....	28
1.6.5. LC-MS/MS.....	29
РОЗДІЛ 2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ ТА УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТУ.	
2.1. Приготування розчинів-стандартів для дослідження факторів утримування на нерухомих фазах.....	32
2.2. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір органічного розчинника.....	33

2.3. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір % вмісту етанолу в рухомій фазі.....	34
2.4. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір компонента рухомої фази – вода чи мурашина кислота.....	35
2.5. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір швидкості рухомої фази.....	36
2.6. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір оптимальної швидкості потоку.....	36
2.7. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір об'єму інжекції.....	37
2.8. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи. Вибір компонента рухомої фази – вода чи мурашина кислота.....	37
2.9. Пробовідбір та пробопідготовка для дослідження Sample A та Sample B	37
2.10. Метод добавок Sample A.....	39
2.11. Метод добавок Sample B.....	41
2.12. Аналіз зразків лаків різного призначення, які доступні на ринку України.....	43
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ОПТИМІЗАЦІЇ МЕТОДИКИ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ.....	45
3.1. Дослідження факторів утримування на нерухомих фазах.....	45

3.2. Результати параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики. Вибір органічного розчинника.....	48
3.2.1 Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-метанол = 80 – 20.....	48
3.2.2 Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%) = 80-20.....	49
3.2.3 Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-метанол=80-20.....	50
3.2.4 Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол=80-20.....	51
3.3. Результати оптимізації параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики. Вибір % вмісту етанолу в рухомій фазі.....	52
3.3.1. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=90-10.....	52
3.3.2. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=80-20.....	53
3.3.3. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=70-30.....	54
3.3.4. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=60-40.....	55
3.3.5. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=90-10.....	57
3.3.6. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=80-20.....	58
3.3.7. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=70-30.....	59

3.3.8. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=60-40.....	60
3.4. Результати оптимізації параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%)=80-20. Вибір компонента рухомої фази води чи мурашина кислота.....	62
3.4.1. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді - етанол(96%)=80-20.....	63
3.4.2. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%)=80-20.....	64
3.4.3. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді – етанол(96%)=80-20.....	65
3.5. Результати оптимізації параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики. Вибір швидкості рухомої фази.....	66
3.6. Результати оптимізації параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики. Вибір оптимальної швидкості потоку.....	67
3.7. Результати оптимізації параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики. Вибір об'єму інжекції.....	69
3.8. Результати оптимізації параметрів для визначення при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді - етанол(96%)=80-20.....	70
3.9. Результати хроматографування в Sample A та Sample B.....	71
3.10. Результати методу стандартних добавок Sample A.....	75
3.11. Результати методу стандартних добавок Sample B.....	77
3.12. Результати аналізу зразків лаків різного призначення, які доступні на ринку України.....	79

РОЗДІЛ 4. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛЯРНИХ НІТРОЗАМІНІВ.

4.1. Лінійність.....	81
4.2. Правильність Sample A.....	85
4.3. Збіжність Sample A.....	88
4.4. Правильність Sample B.....	89
4.5. Збіжність Sample B.....	93
ВИСНОВКИ.....	94
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	96
ДОДАТКИ.....	103

ВСТУП

Нітрозаміни - це молекули, що містять нітрузофункціональні групи, і є добре відомими високомутагенними забруднювачами, що утворюються в результаті реакції вторинних амінів з нітритами в кислих умовах.

Негативний вплив нітрозамінів досліджується протягом багатьох років. Відомо понад 300 їхніх різновидів, причому більше 90% з них мають канцерогенні властивості для живих організмів. Нітрозаміни контролюються у харчових продуктах, косметиці, фармацевтичній продукції, розчинниках. Вони класифікуються як забруднювачі категорії 1 згідно з рекомендаціями ІСН М7 (R1). До того ж, нітрозаміни належать до «групи речовин, що викликають занепокоєння», разом з афлатоксинами, азосполуками та діоксинами.

Актуальність дослідження. В останні роки спостерігається підвищена увага до безпеки косметичних засобів, цим обумовлене прийняття регламенту про косметичні засоби, зокрема лаків для нігтів, які містять різноманітні хімічні сполуки[1]. Особливе занепокоєння викликають нітрозаміни – група потенційно канцерогенних речовин, які можуть утворюватися в косметичних продуктах у процесі їх виробництва, зберігання або використання.

Полярні нітрозаміни мають високу розчинність у воді та здатність проникати через шкіру й нігтьову пластину, що підвищує ризики для здоров'я споживачів. Нітроцелюлоза, що міститься в лаках, за певних умов може стати джерелом утворення нітрозамінів. Визначення нітрозамінів у лаках різного призначення, які присутні на ринку України, є важливим для забезпечення споживачів. Відсутність чітких регламентованих методик визначення цих сполук у лаках для нігтів ускладнює контроль їх вмісту та відповідність продукції вимогам безпеки.

Таким чином, розробка та валідація методики визначення вмісту полярних нітрозамінів у лаках для нігтів є важливим завданням для гарантування належного рівня контролю якості та безпеки косметичних засобів. Результати дослідження можуть бути використані для вдосконалення

нормативної бази, а також сприятимуть мінімізації ризиків для здоров'я користувачів.

Мета: розробити і валідувати екобезпечну методику визначення полярних нітрозамінів лаках для нігтів косметичного і медичного призначення. Провести визначення вмісту нітрозамінів в лаках для нігтів, що доступні на ринку України.

Завдання:

1. Проаналізувати літературні джерела щодо токсичності нітрозамінів, джерел їх утворення в лаках для нігтів, методик визначення.
2. Перевірити можливість заміни типових розчинників для хроматографії на етанол при мас-спектрометричному детектуванні для забезпечення екобезпечності методики.
3. Розробити методику хроматографування та пробопідготовки нітрозамінів у випадку визначення в лаках для нігтів.
4. Провести валідацію методики визначення нітрозамінів в лаках для нігтів.
5. Апробувати розроблену методику на лаках для нігтів різного призначення, що доступні на ринку України.

Об'єкта наукової роботи – NDMA (N нітрозодиметиламін) та NDEA (N-нітрозодіетиламін).

Предметом дослідження є вміст потенційно канцерогенних речовин сполук у лаках для нігтів, зокрема NDMA та NDEA, які можуть утворюватися в процесі виробництва, в процесі реакції з вторинних амінів, а також з такого компонента як нітроцелюлоза

Аналізуючи тему, ми використовували **низку загальнонаукових та хімічних методів**, зокрема рідинну хроматографію з мас-спектрометрією

Новизна наукової роботи полягає у спробі розглянути вплив нітрозамінів негативний вплив на здоров'я, що включає мутагенну та канцерогенну дію при довготривалому використанні.

Теоретичне значення роботи зумовлене прагненням сфокусувати погляд на проблемах безпеки фармацевтичних, косметичних засобів та продуктів харчування та необхідності розробки нових стандартів контролю за їхнім складом для запобігання негативному впливу на здоров'я людини.

Науково-практична цінність проєкту в тому, що його матеріали можуть бути використані у процесі виготовлення і тестування продукції фармакологічної, косметичної та харчової галузей. Результати дослідження можуть сприяти вдосконаленню методів контролю якості та розробці більш безпечних технологій виробництва(наприклад використання більш екобезпечного етанолу замість метанолу).

РОЗДІЛ I. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Поняття нітрозамінів

N-нітрозаміни – це органічні сполуки, які являють собою будь-яку молекулу, що містить нітрозифункціональну групу ($N - N = O$). В органічній хімії «нітрито» відноситься до функціональної групи, в якій група оксиду азоту ($N - N = O$) приєднана до органічної частини. По суті, нітрито можна розділити на C-нітритосполуки (такі як нітритоалкани; $R - N = O$), S-нітритосполуки (нітритотіоли; $RS - N = O$), N-нітритосполуки (наприклад, нітритаміни, $RN(-R') - N = O$) і O-нітритосполуки (алкілнітрити; $RO - N = O$). Загальна структура N-нітритозаміну показана на рис.1.1. [2]. N-нітритозаміни легко утворюються, часто в результаті реакції вторинних і третинних амінів, амідів, карбаматів і похідних сечовини з нітритами або азотовмісними групами [3]. З 2018 року домішки N-нітритозаміну викликають занепокоєння. У лікарських засобах через їх токсичність, мутагенність і канцерогенність.

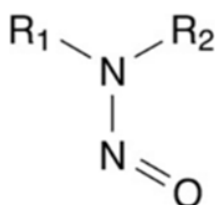


Рис. 1.1. Хімічна структура нітритозаміну

1.1.1. Історія виявлення нітритозамінів

Домішки N-нітритозаміну, були вперше описані в хімічній літературі більше 150 років тому (у 1870-х роках) Отто Віттом[3]. Однак вони не привернули особливої уваги до 1956 року, незважаючи на потенційні канцерогенні домішки як для людини, так і для тварин. У 1956 році двоє британських вчених, Джон Барнс і Пітер Магі, повідомили, що щури та інші тварини страждають від серйозного ураження печінки після введення диметилнітритозаміну (NDMA) перорально або парентерально[4]. Домішки N-

нітрозаміну вперше були виявлені в рибному борошні, потім у в'яленому м'ясі та на більш пізньому етапі в пиві та солоді протягом 70-х років двадцятого століття[5]. Несподівано забруднення нітрозодиметиламіном (NDMA) і спорідненими нітрозамінами сполуками стало проблемою для виробників харчових продуктів і ліків.

Адміністрація (FDA), починаючи з липня 2018 року особливо звернули увагу, коли NDMA було виявлено в деяких продуктах валсартану, виготовлених у Китаї. Згодом список було розширено, щоб включити інші антагоністи рецепторів ангіотензину II (БРА), такі як лозартан та ірбесартан. На основі цих висновків було припущено, що певні процеси синтетичного виробництва відповідальні за утворення цих домішок N-нітрозаміну. У результаті регуляторні органи почали працювати з виробниками, щоб запобігти наявності домішок N-нітрозаміну[6]. Сартани, включаючи кандесартан, ірбесартан, лозартан, олмесартан і валсартан, які належать до класу ліків, відомих як антагоністи рецепторів ангіотензину II, були ретельно перевірені на наявність диметилнітрозаміну (NDMA). Ці ліки в основному використовуються для лікування пацієнтів із гіпертонією, серцевими захворюваннями або захворюваннями нирок[7]. Після виявлення домішок N-нітрозаміну в сартанових продуктах Управління з контролю за продуктами й ліками США (FDA) та Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) оголосили про наявність домішок N-нітрозаміну в генеричних активних фармацевтичних інгредієнтах (АФІ) і лікарських препаратах. За цією заявою по всьому світу відбулося численне відкликання продуктів із сартанами, що призвело до масштабних розслідувань.

На початку вересня 2019 року регулюючі органи охорони здоров'я оголосили, що лікарські засоби, що містять ранітидин, були забруднені неприпустимими рівнями домішок нітрозодиметиламіну[8]. Після цього такі країни, як Сполучені Штати Америки, Канада, Сінгапур, Австралія та Швейцарія відкликали та призупинили дію продаж продукції, що містить

ранітидин, на своїх ринках. Це сталося через те, що ранітидин був другим препаратом, який містить домішки нітрозодиметиламіну, після продуктів сартану. У грудні 2019 року Управління з контролю за продуктами й ліками Сполучених Штатів Америки відзначило, що деякі продукти з метформіном також були забруднені домішками нітрозамінів[9]. Крім того, кілька фармацевтичних компаній отримали листи-попередження щодо сировини, вихідних матеріалів і проміжних продуктів[10].

1.1.2. Джерела утворення

Існує ряд шляхів, за допомогою яких нітрозаміни можуть бути утворенні як домішки у фармацевтичному та косметичному продукті. Зокрема, нітрозаміни утворюються в результаті хімічної реакції вторинних або третинних амінів з нітритами (останні через проміжна деградація) в кислих умовах рис.1.2.

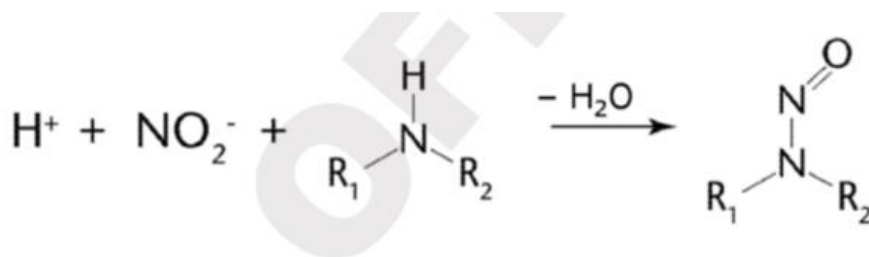


Рис.1.2. Загальне схематичне зображення хімічної реакції, утворення нітрозамінів із вторинних амінів.

Деякі приклади повідомлених джерел, що призводять до утворення нітрозамінів [11-12], включають (але не обмежуються ними) наступне:

- Переробка речовини в певних умовах і в присутності певних реактивів, розчинників, сировини та інші допоміжні засоби обробки. Є докази того, що, незважаючи на етапи обробки та очищення, реакційноздатні речовини додаються навмисно або утворюються під час процесу/послідовності реакції (наприклад, нітрити та вторинні аміни в присутності кислих умов), можуть перенести на наступні етапи. Особливу

увагу слід приділити формуванню азотовмісні гетероцикли шляхом використання азиду з наступним гасінням азотистою кислотою для видалення надлишку азиду.

- Сама лікарська речовина, яка за певних умов може розкладатися, що призводить до утворення нітрозамінів (наприклад, ранітидин).
- Деградація розчинників (наприклад, диметилформамід [DMF]), що призводить до утворення діалкіламінів.
- Домішки в матеріалах і проміжних продуктах, реагентах і розчинниках, що використовуються для приготування вихідних матеріалів або проміжних продуктів.
- Домішки у воді, допоміжних речовинах або технологічних допоміжних речовинах, що використовуються у виробництві готового лікарського засобу.
- При виготовленні лікарського засобу за певних умов реакції та наявності необхідних прекурсорів, необхідних для утворення нітрозамінів.
- Домішки в системі контейнер-укупорка для готового лікарського засобу, які можуть містити домішки, здатні утворювати нітрозаміни, особливо якщо вони пов'язані з матеріалами, що містять аміни та потенційними джерелами нітрозуючих агентів (наприклад, нітритів, нітроцелюлоза).

1.1.3. Утворення нітрозамінів в об'єкті дослідження

Нітрозаміни належать до канцерогенних речовин, що викликають рак та сполук, які заборонені в косметичних засобах. Для генотоксичних, що ушкоджують генетичний матеріал канцерогенів зазвичай неможливо встановити порогове значення для їхньої канцерогенної та генотоксичної дії. Німецькі та швейцарські дослідницькі установи повідомляють про виявлення нітрозамінів (NDMA, NDEA) у лаках для нігтів. Небажана наявність заборонених речовин допускається, якщо продукт є безпечним, а вміст таких речовин технічно неможливо уникнути (стаття 17 Регламенту ЄС про

косметичні засоби № 1223/2009). Ймовірно, що ці нітрозаміни утворюються безпосередньо під час виробництва лаку для нігтів, при цьому джерелом нітрозуючого агента вважається нітроцелюлоза, яка часто використовується в лаках для нігтів. Джерело амінів ще не вдалося точно встановити, але припускають, що речовини стеаралконій гекторит і стеаралконій бентоніт можуть сприяти утворенню нітрозамінів. Технічно уникненні кількості слідів заборонених речовин, таких як досліджувані нітрозаміни, є недопустимими. Відповідальна особа повинна довести в рамках звіту з безпеки, що наявність слідів заборонених речовин є технічно неминучою та безпечною при використанні. Результати досліджень AGES підтверджують припущення, що нітроцелюлоза в поєднанні з використаними амінами, такими як стеаралконій бентоніт та/або стеаралконій гекторит, є причиною забруднення нітрозамінами[48].

1.2. Фармакологія нітрозамінів

1.2.1. Канцерогені нітрозаміни в їжі, воді, ліках та продуктах

Загальна кількість N-нітрозамінів, що містяться в їжі, оцінюється в середньому в $6,7 \pm 0,8$ нг/г, коливаючись від 0 до 120,8 нг/г[13]. NDEA найчастіше виявляли у 387 зразках сільськогосподарських продуктів харчування, тоді як NDMA виявляли найвищу концентрацію в приправах, особливо в обробленій рибі (12,6–322,9 нг/г) і деяких оліях (>10 нг/г) [14]. Середні розрахункові концентрації деяких поширених N-нітрозамінів, виявлених у продуктах харчування, слідує у порядку спадання: NDMA ($2,2 \pm 0,3$ нг/г), NDEA ($0,9 \pm 0,3$ нг/г)[13].

NDMA було виявлено в питній воді, що викликало занепокоєння регуляторних органів щодо його присутності в питній воді. Виникнення NDMA вважається наслідком хлорамінування під час дезінфекції води [15, 16]. NDMA є найпоширенішим забруднювачем N-нітрозаміну в питній воді (середній вміст: $17,7 \pm 4,7$ нг/л), що становить 5–13% від загальної кількості спостережуваних N-нітрозамінів (середнє значення: $39,4 \pm 10,5$ нг/л;

діапазон: 2,8– 309,0 нг/л) у воді. Інші канцерогенні N-нітрозаміни, виявлені в питній воді, включають NDEA ($4,2 \pm 0,8$ нг/л).

Забруднення препаратів N-нітрозамінами привернуло велику увагу через нещодавнє відкликання понад 1400 партій ліків з ринку США [17]. Наявність NDMA була підтверджена Управлінням з харчових продуктів і медикаментів США (FDA) у деяких партіях ранітидину, нізатидину, метформіну та валсартану з 2018 року [18]. Подібним чином виявлення NDEA спричинило вилучення деяких типів ірбесартану, лозартану та валсартану з ринку [18]. Відкриття NDMA та NDEA спонукало регуляторні органи до проведення подальшого аналізу домішок N-нітрозаміну в уражених препаратах [19]. FDA США виявило 5 N-нітрозамінів, які були виявлені в ліках; це NDMA, NDEA— також теоретично вважаються присутніми в лікарських препаратах. Рекомендовані FDA допустимі межі споживання канцерогенних N-нітрозамінів, які обговорюються в цьому огляді, становлять 96 нг/день (NDMA) і 26,5 нг/день (NDEA) [19].

Загальний вміст N-нітрозамінів, які містяться в косметичці, оцінюється в 1507 ± 752 нг/г, коливаючись від 0 до 49 000 нг/г. Відносно високі концентрації N-нітрозамінів, які спостерігаються в косметичці, включаючи засоби догляду за волоссям, мило, шампуні, лосьйони та інші, переважно спричинені NDELA. На його частку припадало 99% загального N-нітрозаміну в цих продуктах. Іншими незначними забруднювачами N-нітрозаміну є NDMA (~0,01%) [13]. NDEA також було виявлено в косметичці на рівнях від 0–40,9 нг/г [20].

1.2.2. Метаболізм NDMA

Біоактивація N-нітрозодиметиламіну (NDMA) у реакційноздатні проміжні продукти відбувається переважно за участю цитохрому P450 2E1 у мітросомах печінки людини [21]. Один із ключових процесів цього перетворення — окислення метильної групи (α -метилгідроксилювання), що призводить до утворення α -гідрокси-NDMA (11, схема 1) — нестабільного і

мутагенного проміжного продукту. Ця сполука піддається спонтанному розкладанню з утворенням формальдегіду (12) та метилдіазогідроксиду (14) [21,22].

Формальдегід може далі окислюватися, утворюючи мурашину кислоту (13) та вуглекислий газ (CO₂) [23,24]. У свою чергу, метилдіазогідроксид зазнає подальшого перетворення, утворюючи високоелектрофільний іон метилдіазонію (15), здатний алкілювати ДНК [25] або сольволізуватися до метанолу [26]. Дослідження з використанням ¹⁵N-міченого NDMA підтвердили, що приблизно 33–67% цієї сполуки метаболізується *in vitro* через α-метилгідроксилування [27–29].

Спостережений ізотопний ефект дейтерію демонструє незначне зниження швидкості метаболічного окислення NDMA для його дейтерованої форми (NDMA-d₆) із співвідношенням V_H/V_D ≈ 1,2. Вплив цього ефекту був більш вираженим при аналізі концентрації ДНК-адуктів, утворених у печінці та нирках після перорального введення [30]. Незважаючи на високу реакційну здатність, метилюючий агент або його попередник (11) виявився достатньо стабільним для виходу з гепатоцитів щура [31].

Крім основного шляху метаболізму, для NDMA також описана ферментативна денітрозація, яка відбувається в мікосоммах печінки та вважається механізмом детоксикації. Основним продуктом цього процесу є метиламін (17), що утворюється через проміжний іон метилімінію (16), а побічним продуктом — формальдегід [32–34].

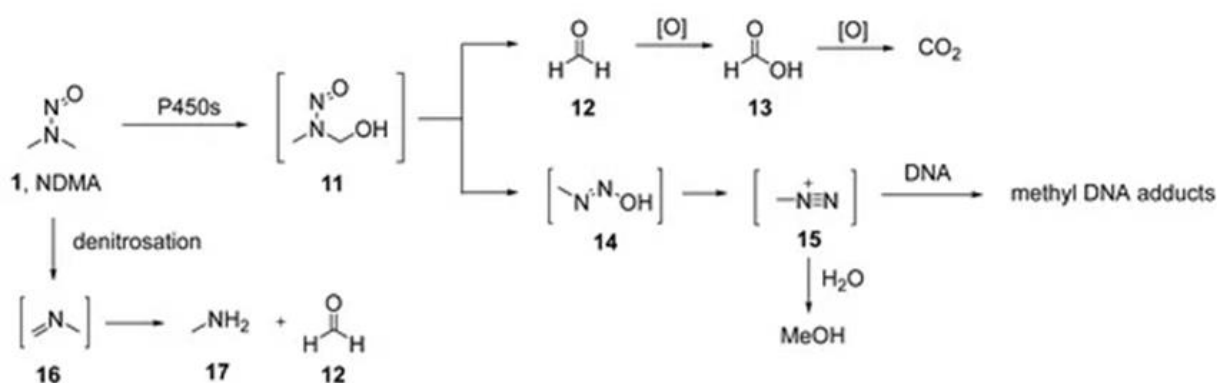


Схема 1. Метаболізм NDMA шляхом α -гідроксилювання та денітрозації.

1.2.3. Метаболізм NDEA

Метаболічна активація N-нітрозодіетиламіну (NDEA), пов'язана з його канцерогенними властивостями, переважно каталізується ізоформами цитохрому P450 2E1 і P450 2A6 [36,37]. Одним із ключових механізмів є α -гідроксилювання, що відбувається на α -вуглецевому атомі етильної групи NDEA під дією ферментів P450. Цей процес призводить до утворення нестабільного проміжного продукту — етилдіазогідроксиду (44), який спонтанно розкладається з утворенням електрофільного етилдіазонієвого іону (45, схема 4). У свою чергу, цей іон взаємодіє з ДНК, спричиняючи утворення адуктів етил-ДНК, зокрема N7-етилгуаніну (N7-Et-Gua) та O6-етилгуаніну (O6-Et-Gua). Одночасно з цим процесом внаслідок α -гідроксилювання NDEA також утворюється ацетальдегід (42) [38].

Гідроксилювання на β -вуглецевому атомі призводить до утворення реакційноздатного 2-гідроксіетилдіазонієвого іону (100) через вторинне α -гідроксилювання іншої етильної групи NDEA. Цей електрофільний іон також здатний алкілювати ДНК, утворюючи адукти, зокрема N7-гідроксіетилгуанінін (N7-HOEt-Gua, 69), які були виявлені в ДНК печінки щурів, що отримували NDEA [39].

Конкуруючим із біоактивацією шляхом є денітрозація, що свідчить про подвійну роль цитохрому P450 у біотрансформації NDEA. Цей процес може діяти як захисний механізм, знижуючи рівень утворення реакційноздатних метаболітів і, відповідно, канцерогенний потенціал NDEA [40].

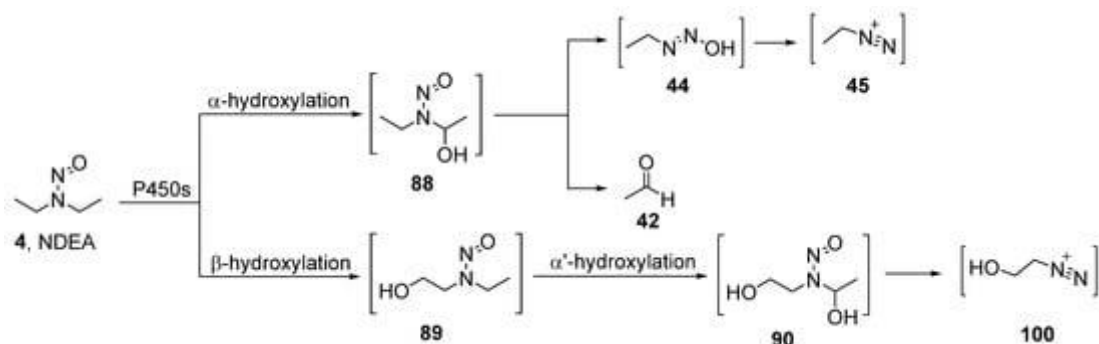


Схема 2. Механізми метаболічної активації NDEA.

1.3. Ризик для пацієнтів

Європейське агентство з лікарських засобів (EMA) визначило ризик розвитку раку протягом життя становить 1 на 5000 пацієнтів, які приймали відповідний препарат валсартан на найвища доза 320 мг щодня з липня 2012 року по липень 2018 року. А. Поттергард та ін. провів прискорену оцінку ризик раку, пов'язаний із впливом продукту, забрудненого NDMA у 5150 данських пацієнтів, які застосовували валсартан і не мали історія раку. За пацієнтами спостерігали в середньому лише 4,6 року. Коефіцієнт ризику для загального раку становив 1,09, що означає низький короткостроковий ризик. Так само FDA вчені підраховували, що якби пацієнти приймали, а максимальна доза 320 мг валсартану щодня протягом 4 років ймовірність розвитку ще одного випадку раку становить 1 до 8000.

Тим не менш, присутність NDMA широко поширена використовується для дослідження раку у фармацевтичних продуктах питания та проблеми. Міжнародне агентство з дослідження раку (IARC) класифікував NDMA як ймовірний канцероген люди [41]. Шляхом канцерогенної активності є біотрансформація в іон метилдіазонію мікросомами печінки ферменти, які, у свою чергу, утворюють адукти ДНК, такі як O₆-метилгуанін, ймовірний канцерогенний агент. Позитив спостерігався зв'язок між експозицією та реакцією для прийому NDMA та раку шлунка та легенів. Кнект та ін. також спостерігав позитивне кореляці між прийомом NDMA і наступне виникнення колоректального раку з відносним ризиком 2,12 у популяції 9985 дорослих фінських чоловіків і жінок за період спостереження 24 роки (42). NDEA вважається одним з найпотужніших для печінки канцерогеном серед нітрозамінів. Як і NDMA, NDEA є біотрансформується з утворенням іона етилдіазонію ферментами цитохрому р450 (переважно CYP2E1). Етилдіазоній іон може реагувати з нуклеофільними ділянками ДНК і утворювати продукти, які можуть викликати рак [43].

1.4. Допустима добова доза

Створено інтегровану систему інформації про ризики (IRIS), що при концентрації 7×10^{-4} мкг/л NDMA в питній двох літрів води на день призведе до життя кожного мільйона (10-6) ризик раку у людини вагою 70 кг. USFDA встановив рівні дії 5 мкг/л і 0,01 мкг/г у солодових напоях і ячмені солоду відповідно NDMA [44]. На основі щоденного впливу NDMA або NDEA, що призводить до ризику раку 1:100 000 після 70 років експозиції, FDA встановила тимчасову допустиму добову дозу межі споживання (ADI) для цих домішок у сартанах (41)

1.5. Контроль домішок нітрозаміну

Контроль домішок у лікарських субстанціях, допоміжних речовинах і продуктах, зазвичай відповідають специфікаціям, опублікованим в офіційних фармакопеях, наприклад, Фармакопея США (USP), Британська Фармакопея (BP), Європейська Фармакопея (pH. Eur.) або Міжнародна Фармакопея (pH. Int.), залежно від політики регіону чи країни. Крім того, Міжнародна рада з гармонізації технічних вимоги до якості лікарських засобів для використання людиною (ICH). Рекомендації Q3A, Q3B, Q3C і Q3D містять вичерпні вказівки і науково охоплюють низку домішок, включаючи як органічні і неорганічних домішок, а також залишкових розчинників, поняття про який був прийнятий більшістю фармакопей. Однак специфікації, опубліковані у фармакопейних монографіях, далекі від досконалості, особливо з точки зору контролю домішок, оскільки більшість монографій, навіть ті, що нещодавно випущені, були розроблені для контролю органічних домішок за допомогою звичайних методів, таких як ВЕРХ, без можливості виявлення слідових кількостей нітрозамінів.

Хоча ICH опублікувала рекомендації M7 для оцінки та контролю мутагенних факторів домішок, у тому числі нітрозамінів у фармацевтичних препаратах, існує ще великий виклик для виробників ліків і регуляторних органів встановити заходи контролю мутагенів у фармацевтиці[45]. Ідентифікація та кількісна оцінка раніше описаних мутагенних видів

непроста і вимагає вичерпних досліджень, оскільки також сучасні аналітичні засоби, які можуть кількісно визначити сліди кількості домішок. Щоб контролювати забруднення нітрозаміні та фактично будь-які інші види домішок у фармацевтичних препаратах, виробники ліків повинні розуміти обмеження фармакопейні монографії та розпочати впровадження власної наукової оцінки заходів контролю.

Аналіз нітрозамінів як в АФІ, так і в лікарських препаратах служить остаточний захід для точного визначення їх рівні забруднення. У цьому відношенні валідність аналітичних методів для виявлення канцерогенів буде найбільшим викликом. Під час аналізу має бути виявлено як утворення нітрозамінів на місці, так і їхнє забруднення реагентами, наприклад водою. Як зазначено в листі FDA США до Valisure LLC, невідповідні методи тестування можуть спричинити штучні рівні NDMA [46]. Аналітичні методи, які можуть виявити різноманітні види нітрозамінів стане активом для подолання будь-яких ризиків. Дані про токсичність виявлених нітрозамінів недоступні, рівні токсичності для їх мутагенності та канцерогенності можуть бути охарактеризовані та використані для визначення їх допустимих меж. Крім того, ЕМА повідомляє про допустимі межі нітрозамінів і FDA США тепер базуються на окремих хімічних речовинах. Якщо їхні синергетичні ефекти необхідно враховувати, як описано в ІСН М7, це можливо, що такі обмеження можуть бути посилені в майбутньому, якщо це буде більше виявлено більше одного виду нітрозамінів.

1.6. Методика визначення

1.6.1. GC-MS/MS

Прилади та обладнання: Газовий хроматограф з автосамплером рідини та потрійним квадрупольним мас-селективним детектором, скляний посуд класу А,

центрифуга, колонка VF-WAX_{ms} GC: 30 м x 0,25 мм, 1,00 мкм,
вихровий змішувач, одноразові скляні центрифужні пробірки на 15 мл,
нейлонові фільтри 0,45 мкм, шприци 5 мл

Реагенти: Хлористий метилен, N-нітрозодиметиламін (NDMA): 100
мкг/мл у MeOH, N-нітрозодидетиламін (NDEA): 1 мг/мл у MeCl₂, Мічений N-
нітрозодиметиламін-C13-d6 (NDMA:C13-d6): 1 мг/мл у MeCl₂

Умови для аналізу NDMA та NDEA за допомогою GC та MS

Параметр	Умови для газового хроматографа (GC)	Умови для мас-спектрометра (MS)
Температура інжектора	250°C	-
Температура трансферної лінії	250°C	-
Тип інжекції	Пульсований Splitless при 12,285 psi, утримування 0,5 хв	-
Об'єм інжекції	2 µL	-
Швидкість потоку	1 мЛ/хв	-
Програма нагрівання печі	Початкова температура 40°C, утримування 0,5 хв; підвищення до 200°C зі швидкістю 20°C/хв; далі до 250°C зі швидкістю 60°C/хв, утримування 3 хв	-

Загальний час аналізу	12,33 хв	-
Температура джерела іонізації	-	250°C
Температура квадруполей	-	150°C (Q1 та Q2)
Газ для гасіння	-	Гелій, 4 мЛ/хв
Газ для зіткнення	-	Азот, 1,5 мЛ/хв
Енергія електронів	-	-30 еВ
Затримка для розчинника	-	6,5 хв
Завершення аналізу (QQQ)	-	8,5 хв
Час запуску MRM для NDMA	-	4,00 хв
Час запуску MRM для NDEA	-	7,80 хв

NDMA та NDEA MRM Умови

Параметр	NDMA MRM 1 (Quantitation)	NDMA MRM 2	NDEA MRM 1 (Quantitation)	NDEA MRM 2	NDMA:C13-d6 MRM (Quantitation)
Переходи (amu)	74amu → 44amu	74amu → 42amu	102amu → 85amu	102amu → 56amu	82amu → 48amu

Час зупинки (Dwell Time)	150 ms	5 0 ms	150 ms	15 0 ms	100 ms
Енергія зіткнення (CE)	15 V	20 V	10 V	18 V	20 V
Роздільна здатність MS1 і MS2	MS1: Unit, MS2: Wide	MS1: Unit, MS2: Wide	MS1: Wide, MS2: Wide	MS1: Wide, MS2: Wide	MS1: Unit, MS2: Wide

1.6.2. LC-HRMS

Реагент

- Довідкові стандарти для NDMA, NDEA
- Мурашина кислота, рівень PX/MC (Fisher A117-50 або еквівалент)
- Метанол, рівень PX/MC (Fisher A456-4 або еквівалент)
- Вода, PX/MC або еквівалент
- 2-пропанол марки LC

Обладнання/Інструмент

- Система ВЕРХ або УВЕРХ, оснащена автоматичним пробовідбірником із контрольованою температурою та колонкою відсік
- Гібридний квадрупольний орбітальний мас-спектрометр Q Exactive™ або Q Exactive™ HF-X гібридний квадрупольний орбітальний мас-спектрометр (ThermoFisher Scientific)
- Колонка ВЕРХ: Kinetex® 2,6 мкм F5 100 Å, 100 x 4,6 мм (Phenomenex, арт. № 00D4723-E0)

- Аналітичні ваги
- Вихровий змішувач
- 15 мл скляні центрифужні пробірки
- Наручний шейкер
- Шприцеві фільтри PVDF 0,22 мкм
- Центрифуга
- Флакони ВЕРХ

Хроматографічні умови

HPLC Колонка	Kinetex® 2.6 μm F5 100 Å, 100 x 4.6 mm (Phenomenex, Part No. 00D-4723-E0)
Температура колонки	40 °C
Швидкість потоку	0.6 мл/хв
Рухома фаза А	0.1% мурашина кислота у воді
Рухома фаза В	0.1% мурашина кислота у метанолі
Об'єм ін'єкції	3 μL
Температура автосемплера	4 - 8 °C
Промивка голки	80:20, Метанол:Вода з 0.1% мурашиної кислоти

Умови мас-спектрометра

- Інструмент: Мас-спектрометр Q Exactive™ (ThermoFisher) або масовий Q Exactive™ HF-X спектрометр (ThermoFisher)
- Параметри джерела іонів (застосовуються як до негативного, так і до позитивного режимів)[47].

Умови роботи приладу

Швидкість потоку газу-оболонки	55 умовних одиниць
Швидкість потоку додаткового газу	15 умовних одиниць
Швидкість потоку змиваючого газу	0 одиниць
Напруга розпилення	3.5 кВ
Температура капіляра	400 °С
S-лінза	55 (застосовується до Q Exactive™)
Рівень RF у лійці	25 (застосовується до Q Exactive™ HF-X)
Температура нагрівача додаткового газу	350

1.6.3. RP-HPLC

Реагенти: Стандарти: N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-нітрозодіетиламін (NDEA). Для приготування зразка гідроксид натрію, етанол, октан і дихлорметан (DCM). Усі інші хімічні речовини (аскорбінова кислота, безводний сульфат натрію та хлорид натрію), які використовувалися в цьому дослідженні, мали аналітичний лабораторний ацетонітрил, метанол і воду (клас ВЕРХ), кислоту гідроксиду амонію та воду для ВЕРХ. Шприцевий фільтр PVDF 0,22 мкм.

Обладнання/інструменти: пробірки Ругех (20 мл) з термостійкими кришками з тефлоновим покриттям. Скляна колона (30 см × 1,5 см). Для концентрування органічних розчинників використовували концентратор

Kuderna Danish (KD). Автоклав (Selecta, Іспанія, 4001757). CAMAG UV Lamp подвійна довжина хвилі, 254/366 нм, 2 × 8 Вт в комбінації (Швейцарія). Система KNAUER® HPLC (KNAUER®, Німеччина), що складається з інтелектуального диспетчера лінії, диспетчера зразків і smartline УФ-детектора 2500. Контроль системи, збір даних і обробка даних здійснювалися за допомогою програмного забезпечення для даних хроматографії Eurochrom™[49].

Хроматографічні умови

Параметр	Умова
Хроматографічна колонка	Knauer Symmetry C18, 5 мкм (100 мм × 4,6 мм)
Розчинник А	10 мМ гідроксид амонію
Розчинник В	Ацетонітрил
Фільтрація	Фільтрація через мембранний фільтр PVDF 0,22 мкм та дегазація під вакуумом
Режим розділення	Гرادієнтне елюювання з використанням розчинників А і В
Дилуент	Розчинник А
Об'єм ін'єкції	20 мкл
Градiєнт елюювання	Розчинник В: від 0 до 90% протягом 10 хвилин, потім підтримується до кінця аналізу
Швидкість потоку	1,0 мл/хв
Температура колонки	80°C
Довжина хвилі детектування	231 нм

Температура зразка	15°C
Зворотний тиск у системі	Близько 2500 psi

1.6.4. HPLC-MS/MS

Реагенти, стандарти та зразки: Ацетонітрил (для ВЕРХ, градієнт класу,

≥99,9%), Метанол (для ВЕРХ, градієнтна чистота, ≥99,9%), Мурашина кислота (реагент ACS, ≥96%), Очищена вода, Формат амонію (елюентна добавка для LC-MS) Стандарти домішок нітрозаміну: N-нітрозодиметиламін (NDMA), N-Nitrosodiethylamine (NDEA).

Обладнання та параметри аналізу: Високоєфективний рідинний хроматограф Agilent Infinity II з детектором MS (MSD 6460 Потрійний квадроцикл). Колонка – Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 50 мм, 3,0 мм, 2,7 мкм (кат. 699975-302)[50].

Хроматографічні умови

Параметр	Умова
Температура колонки	50°C
Швидкість потоку	0.4 мл/хв
Рухома фаза А	0.1% мурашина кислота в 10 мМ водному розчині форміату амонію
Рухома фаза В	0.1% мурашина кислота в метанолі
Об'єм ін'єкції	8 мкл
Час зупинки	5 хв
Час після закінчення	3.5 хв

Налаштування MS

Параметр	Умова
Тип іонізаційного джерела	APCI (хімічна іонізація при атмосферному тиску)
Температура газу сушіння	350°C
Нагрівач APCI	350°C
Швидкість потоку газу сушіння	6 л/хв
Тиск небулізатора	40 psi
Напруга капіляра, позитивна	4,000 V
Струм голки APCI, позитивна	4 μ A
Тайм-фрейм – NDMA	0.986 – 1.556 хв
Тайм-фрейм – NDEA	4.082 – 4.284 хв

1.6.5. LC-MS/MS

Реагенти: розчинники та реагенти класу LCMS, які мають найвищу чистоту >99,8%, вода, метанол, мурашина кислота та стандарти домішок нітрозаміну (NDMA, NDEA).

Обладнання: Хроматографічне розділення виконується за допомогою 1290 Infinity II (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія) UHPLC, оснащеного бінарним насосом, мультисемплером і детектором з діодною матрицею, поєднаним із Agilent 6470 (Agilent technology., Санта-Клара, Каліфорнія) потрійний квадруполь LC-MS/MS з APCI (атмосферний хімічна іонізація під тиском) розділ. Колонка Agilent Zorbax Eclipse plus C18 150 \times 3,0 мм 3,5 мкм (Agilent Technologies, Санта-Клара, Каліфорнія), використовується для розділення домішок нітрозаміну[52].

Хроматографічні умови

Параметр	Умова
Рухома фаза А	0,1% мурашина кислота у воді
Рухома фаза В	0,1% мурашина кислота в метанолі
Швидкість потоку	0,3 мл/хв
Час аналізу	18 хв
Температура колонки	40°C
Температура автосамплера	10°C
Об'єм ін'єкції	20 мкл
Програма градієнту	0,00/5, 3,00/5, 7,00/60, 11,00/95, 15,00/95, 15,1/5, 18,00/5

Налаштування MS

Параметр	Значення
Режим іонізації	Позитивний режим АРСІ
Іони MRM	m/z 75.1, 103.1
Сполуки	NDMA, NDEA
Напруга капіляра	4000 В
Струм голки АРСІ	4 мкА
Температура газу сушіння	300°C
Швидкість потоку газу сушіння	6 л/хв
Тиск небулізатора	35 psi
Температура нагрівача АРСІ	350°C
Програмне забезпечення	Agilent Mass Hunter версія 10.1

**РОЗДІЛ 2. ПРИГОТУВАННЯ РОЗЧИНІВ ТА УМОВИ
ЕКСПЕРИМЕНТУ.**

2.1. Приготування розчинів-стандартів для дослідження факторів утримування на нерухомих фазах.

Стандарт NDEA: 40334 N-Nitrosodiethylamine solution, 5000µg/ml in methanol. Серія LRAD4465. 28/02/26. SIGMA-ALDRICH, Germany.

Стандарт NDMA: CRM40059 N-Nitrosodimethylamine solution, 5000µg/ml in methanol, ampule of 1 ml. Серія LRAD1816. 31/03/25. SIGMA-ALDRICH, Germany.

Для приготування, ми взяли стандарти NDMA та NDEA, колби місткістю 20 мл. За допомогою піпетки відміряли 20 мкл на 20 мл. Поступово додаємо 5 мл метанолу і доводимо до мітки водою.

Встановлення фактору утримування NDEA,NDMA

Прилад: Agilent 1100 з діодно-матричним детектором;

Реактиви: вода для ВЕРХ, етанол 96%;

Розчини NDEA,NDMA;

Колонка: 1. Discovery HS F5 250*4.6 5µm (SiO₂-PFP), 2. Ascentis Phenyl 250*4.6 5µm, 3. Discovery HS C18 250*4.6 5µm

Умови хроматографії:

Швидкість рухомої фази: 1,0 мл/хв;

t= 40°C

λ= 228 нм

V_{інжекції}= 20 мкл

Рухома фаза: EtOH - H₂O 7 співвідношень, 10-90; 15-85; 20-80; 25-75;30-70;35-65;40-60;45-55;50-50.

2.2. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи

Вибір органічного розчинника

Для хроматографування згідно методики, що наводиться в фармакопеї Європи (посилання) використовують такий розчинник, як метанол. Метою дослідження було перевірити чи можна замінити метанол на екобезпечний розчинник, наприклад етанол. Етанол 96 % був попередньо перегнаний при атмосферному тиску для забезпечення максимальної його чистоти.

Умови експерименту:

Колонка: без колонки, замість колонки з'єднувач

Рухома фаза: вода-метанол=80-20 або вода-етанол (96%)=80-20

Температура : 45°C

Швидкість потоку: 0,3 мл/хв

Інжекція: 1 мкл

Розчин NDMA: 100 нг/мл

Розчин NDEA: 100 нг/мл

Прилад: Хроматограф Шімадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LC-8040 (рис. 2.1).



Рис. 2.1. Хроматограф Шімадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LC-8040

Для оптимізації параметрів мас-детектування використовували опцію програмного забезпечення Optimization for method (Optimize voltage + Adjust product + adjust precursor)

2.3. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи.

Вибір % вмісту етанолу в рухомій фазі

Для хроматографування згідно методики, що наводиться в фармакопеї Європи (2.5.42 "N-nitrosamines in active substances", Procedure A (LS-MS/MS), р. 200) використовують такий розчинник як метанол. Метою дослідження було визначити, який відсоток етанолу буде краще використувати під час наших досліджень. Етанол 96 % був попередньо перегнаний при атмосферному тиску для забезпечення максимальної його чистоти рис.2.2.



Рис. 2.2. Перегін етанолу

Умови експерименту:

Колонка: без колонки, замість колонки з'єднувач

Рухома фаза: вода-етанол (96%)=80-20; 70-30; 60-40

Температура : 45°C

Швидкість потоку: 0,3 мл/хв

Інжекція: 1 мкл

Розчин NDMA: 100 нг/мл

Розчин NDEA: 100 нг/мл

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LC-8040.

2.4. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи

Вибір компонента рухомої фази – вода чи мурашина кислота

Для хроматографування згідно методики, що наводиться в фармакопеї Європи (2.5.42 "N-nitrosamines in active substances", Procedure A (LS-MS/MS), р. 200) використовують воду як компонент рухомої фази, а в фармакопеї США 0,1% мурашину кислоту. Метою дослідження було перевірити чи є переваги використання 0,1% мурашиної кислота замість води.

Умови експерименту:

Колонка: без колонки, замість колонки з'єднувач

Рухома фаза: вода-етанол (96%)=80-20 або 0,1% мурашина кислота у воді - етанол (96%)=80-20

Температура : 45°C

Швидкість потоку: 0,3 мл/хв

Інжекція: 1 мкл

Розчин NDMA: 100 нг/мл

Розчин NDEA: 100 нг/мл

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040

Для оптимізації параметрів мас-детектування використовувати опція програмного забезпечення Optimization for method (Optimize voltage + Adjust product + adjust precursor).

2.5. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи.

Вибір швидкості рухомої фази

Це важлива характеристика, оскільки для мас-детектування сполуки після проходження колонки і потрапляння в детектор всю рідину потрібно випарувати і повнота випаровування буде впливати на процеси, що відбувається в детекторі, а потім і на межу детектування.

Умови експерименту:

Колонка: Discovery C18 250*4.6 5 μ m

Рухома фаза: вода-етанол (96%)=80-20

Температура: 45°C

Швидкість потоку: 1,0 мл/хв і 0,5 мл/хв

Інжекція: 1 мкл

Розчин NDMA: 100 нг/мл

Розчин NDEA: 100 нг/мл

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040

2.6. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи.

Вибір оптимальної швидкості потоку

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3.5

Рухома фаза: вода-етанол 96%=80-20

Температура колонки: 45°C

Швидкість потоку: 0,5; 0,4; 0,3; 0,2.

Об'єм інжекції: 1 мкл

Розчин: 100нг/мл NDMA та NDEA.

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.7. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи.

Вибір об'єму інжекції

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3.5

Рухома фаза: вода-етанол 96%=80-20

Температура колонки: 45°C

Швидкість потоку: 0,4 мл/хв

Об'єм інжекції: 1,5,10,20,50 мкл

Розчин: 10нг/мл NDMA та NDEA.

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.8. Приготування розчинів стандартів для оптимізації параметрів хроматографічної системи.

Вибір компонента рухомої фази – вода чи мурашина кислота

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3.5

Рухома фаза: вода-етанол 96%=80-20

Температура колонки: 45°C

Швидкість потоку: 0,4 мл/хв

Об'єм інжекції: 1,5,10,20,50 мкл

Розчин: 10нг/мл NDMA та NDEA.

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.9. Пробовідбір та пробопідготовка для дослідження Sample A та Sample B

Для проведення експериментальних досліджень було підготовлено конічні центрифужні пробірки. За допомогою аналітичних ваг здійснено

відбір наважки трьох зразків Sample A(рис. 2.3.)та трьох зразків Sample B(рис.2.4.), кожен з масою приблизно 50 мг.

Маси наважок:

• **Sample A:**

- A1 = 50,5 мг
- A2 = 55,7 мг
- A3 = 48,7 мг

• **Sample B:**

- B1 = 54,9 мг
- B2 = 44,8 мг
- B3 = 54,6 мг

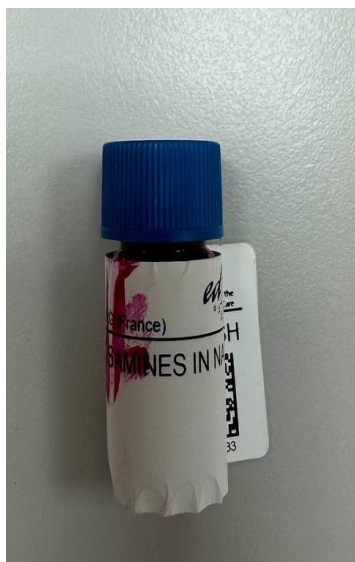


Рисунок 2.3. Sample A



Рисунок 2.4. Sample B

Для розчинення проб застосовано метанол у кількості 1 мл на кожен зразок. Після додавання розчинника проби піддавалися ультразвуковому впливу для забезпечення ефективного розчинення (рис.2.5.)

Наступним етапом було додавання 4 мл високоочищеної води до кожної пробірки. Підготовлені проби центрифугували на центрифугузі Heraeus Biofuge Primo R протягом 10 хвилин при швидкості 5000 об/хв. За допомогою шприца та шприцевого фільтру, проби були перенесені у хроматографічні віалки для подальшого дослідження (рис.2.6.).

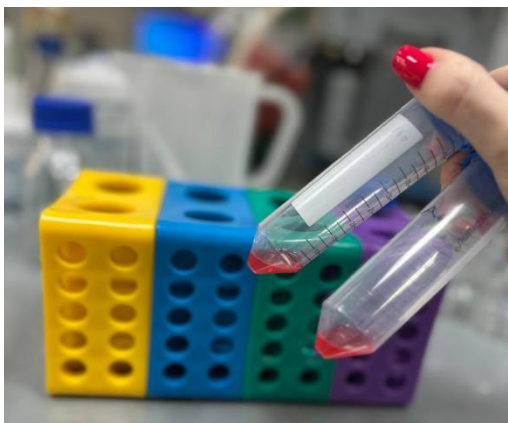


Рис. 2.5. Пробопідготовка

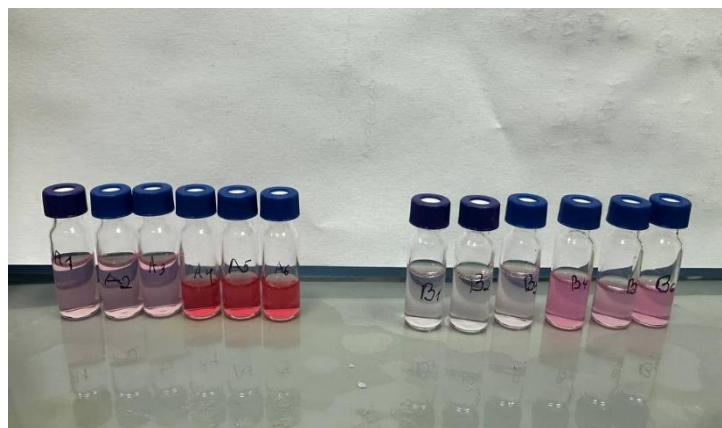


Рис. 2.6. Зразки для хроматографування

Наступним етапом було підготувати стандартний розчин NDMA та NDEA. Для приготування, ми використали колби місткістю 20 мл. За допомогою піпетки відміряли 20 мкл NDMA та NDEA. Поступово додаємо 5 мл MeOH та доводимо до мітки водою. 5мг/мл в 1000 раз розводимо та отримуємо 5 мкл/мл. Нам необхідно отримати концентрацію 50 нг/мл, тому потім розводимо ще в 100 разів. Далі розводимо за допомогою автосемплера. Обережно все переносимо до віалок.

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3,5;

Рухома фаза А: 0,1% HCOOH;

Рухома фаза В: MeOH;

Об'єм інжекції: 1,2,5,10,20 мкл;

St = 50 нг/мл в 20% MeOH;

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.10. Метод добавок Sample A

Для проведення дослідження приготували 6 центрифужних пробірок для **Sample A**. В кожну відважили **Sample A** маси наважок:

1-а пробірка – 49,2 мг;

2-а пробірка – 47,7 мг;

3-я пробірка – 48,9 мг;

4-а пробірка – 54,0 мг;

5-а пробірка – 52,4 мг;

6-а пробірка – 54,8 мг.

В кожен пробірку додали по 0,25 мл етилацетату. Розчинили за допомогою Vortex V-1 plus. Також додали 0,75 мл MeOH та ретельно перемішали.

Наступним етапом було додавання стандартного розчину з концентрацією 50 нг/мл:

1-а пробірка – залишається без додавання стандарту;

2- а пробірка – +100 мкл;

3-я пробірка - +200 мкл;

4-а пробірка - +300 мкл;

5-а пробірка - +400 мкл;

6-а пробірка - +500 мкл.

Виконуємо таку саму маніпуляцію.

Провели розрахунок, яку кількість води тепер ми маємо додати і в свою чергу отримали:

1-а пробірка – 4 мл;

2- а пробірка – 3,9 мл;

3-я пробірка – 3,8 мл;

4-а пробірка - 3,7 мл;

5-а пробірка – 3,6 мл;

6-а пробірка – 3,5 мл.

Все перемішуємо та ставимо в центрифугу Heraeus Biofuge Primo R на 10 хвилин зі швидкість 5000 об/хв.

Після з кожної пробірки відібрали зразки і перенесли у віалку для хроматографування для проведення подальшого дослідження.

Наступним етапом було підготувати стандартний розчин NDMA та NDEA. Для приготування, ми використали колби місткістю 20 мл. За допомогою піпетки відміряли 20 мкл NDMA та NDEA. Поступово додаємо 5 мл MeOH та доводимо до мітки водою. 5мг/мл в 1000 раз розводимо та отримуємо 5 мкл/мл. Нам необхідно отримати концентрацію 50 нг/мл, тому потім розводимо ще в 100 разів.

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3,5;

Рухома фаза А: 0,1% HCOOH;

Рухома фаза В: MeOH;

Об'єм інжекції: 1,2,5,10,20 мкл;

St = 50 нг/мл в 20% MeOH;

Прилад: Хроматограф Шимадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.11. Метод добавок Sample B

Для проведення дослідження приготували 6 центрифужних пробірок для **Sample B**. В кожну відважили **Sample B** маси наважок:

1-а пробірка – 52,1 мг;

2-а пробірка – 49,0 мг;

3-я пробірка – 51,3 мг;

4-а пробірка – 56,4 мг;

5-а пробірка – 52,1 мг;

6-а пробірка – 49,7 мг.

В кожну пробірку додали по 0,25 мл етилацетату. Розчинили за допомогою Vortex V-1 plus. Також додали 0,75 мл MeOH та ретельно перемішали.

Наступним етапом було додавання стандартного розчину з концентрацією 50 нг/мл:

1-а пробірка – залишається без додавання стандарту;

2- а пробірка – +100 мкл;

3-я пробірка - +200 мкл;

4-а пробірка - +300 мкл;

5-а пробірка - +400 мкл;

6-а пробірка - +500 мкл.

Виконуємо таку саму маніпуляцію

Провели розрахунок, яку кількість води тепер ми маємо додати і в свою чергу отримали:

1-а пробірка – 4 мл;

2- а пробірка – 3,9 мл;

3-я пробірка – 3,8 мл;

4-а пробірка - 3,7 мл;

5-а пробірка – 3,6 мл;

6-а пробірка – 3,5 мл.

Все перемішуємо та ставимо в центрифугу Heraeus Biofuge Primo R на 10 хвилин зі швидкість 5000 об/хв.

Після з кожної пробірки відібрали зразки і перенесли у віалку для хроматографування для проведення подальшого дослідження.

Підготували стандартний розчин NDMA та NDEA. Ми використали колби місткістю 20 мл. За допомогою піпетки відміряли 20 мкл NDMA та NDEA. Поступово додаємо 5 мл MeOH та доводимо до мітки водою. 5мг/мл в 1000 раз розводимо та отримуємо 5 мкл/мл. Нам необхідно отримати концентрацію 50 нг/мл, тому потім розводимо ще в 100 разів.

Умови експерименту:

Колонка: XBridge C18 150*3/3,5;

Рухома фаза А: 0,1% HCOOH;

Рухома фаза В: MeOH;

Об'єм інжекції: 1,2,5,10,20 мкл;

St = 50 нг/мл в 20% MeOH;

Прилад: Хроматограф Шімадзу LC-30 з триквадрупольним мас-детектором LCMS-8040.

2.12. Аналіз зразків лаків різного призначення, які доступні на ринку України.

Для дослідження використовували такі зразки:

Зразок 1 – Лак лікувальний (Аморолфін-Інтелі лак д/нігт. 50 мг/мл по 2.5 мл у флаконі. Шанель Медікал Анлімітед Компані. Країна виробництва - Індія);

Зразок 2 – Лак декоративний (Лак для нігтів LCF Mini Nail Polish, 5 мл. Країна виробник – Україна)

Зразок 3 – Лак декоративний (Лак для нігтів Jerden Gel Effect, 9 мл. Країна виробник - Україна)

Зразок 4 – Лак декоративний (Лак для нігтів NYD Professional Summer Wave Nail Polish, 5 мл. Країна виробник - Україна)

Приготували 4 центрифужні пробірки, по 1 для кожного зразку.

Відібрали маси наважок:

Зразок 1 – 50,2 мг;

Зразок 2 – 53,2 мг;

Зразок 3 – 52,7 мг;

Зразок 4 – 49,7 мг.

В кожен пробірку додали по 0,2 мл етилацетату. Розчинили за допомогою Vortex V-1 plus. Також додали 0,8 мл MeOH та ретельно перемішали. До кожного зразку додали 4 мл високоочищеної води.

Підготовлені проби центрифугували на центрифугу Heraeus Biofuge Primo R протягом 10 хвилин при швидкості 5000 об/хв. Потім отриманий розчин перенесли до віалок для хроматографування (рис 2.7.)



Рисунок 2.7. Відібрані проби зразків

Підготовка стандартного розчину NDMA та NDEA. Ми використали колби місткістю 20 мл. За допомогою піпетки відміряли 20 мкл NDMA та NDEA. Поступово додаємо 5 мл MeOH та доводимо до мітки водою. 5мг/мл в 1000 раз розводимо та отримуємо 5 мкл/мл. Нам необхідно отримати концентрацію 50 нг/мл, тому потім розводимо ще в 100 разів.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ОПТИМІЗАЦІЇ МЕТОДИКИ ТА КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ

3.1. Дослідження факторів утримування на нерухомих фазах.

1. Discovery HS F5 250*4.6 5mkm (SiO₂-PFP)



Рисунок 3.1. Фактор утримання NDEA та NDMA на колонці Discovery HS F5 250*4.6 5mkm (SiO₂-PFP) у різних співвідношеннях етанол-вода.

Отже, при використанні колонки Discovery SiO₂-PFP спостерігається залежність утримання NDMA і NDEA від концентрації компонента (ймовірно, розчинника) (рис 3.1). Зменшення концентрації сприяє збільшенню факторів утримання k_{NDMA} та k_{NDEA} , що свідчить про посилення взаємодії аналізованих сполук із нерухомою фазою колонки. Оскільки Discovery SiO₂-PFP містить пентафлуорофенільну (PFP) групу, яка забезпечує полярну селективність та можливість π - π -взаємодій, більш високий фактор утримання NDEA порівняно з NDMA може бути пояснений його вищою гідрофобністю, оскільки розрахункове значення Log P NDEA складає 0,5, а для NDMA LogP=0,6. Тому NDMA, через свою вищу полярність, утримується на нерухомій фазі менше. Збільшення утримання NDEA відбувається із зменшенням концентрації органічного розчинника свідчить про значний внесок в утримування гідрофобних взаємодій, тоді як NDMA значного покращення

утримування не відбувається, що свідчить про те, що ця сполука утримується в основному за рахунок диполь-дипольних і π - π -взаємодій. Це знання можна використовувати для налаштування параметрів елюенту з метою оптимального розділення і утримування NDMA та NDEA.

2. Ascentis Phenyl 250*4.6 5 μ m

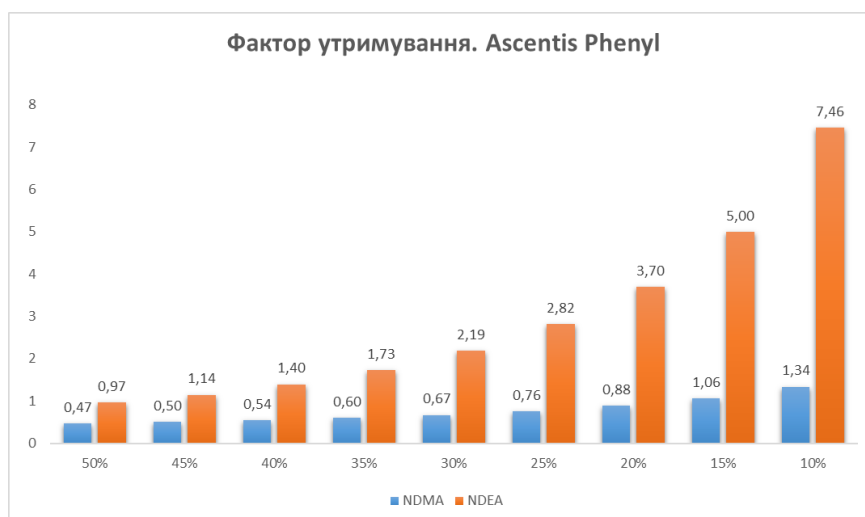


Рисунок 3.2. Фактор утримання NDEA та NDMA на колонці Ascentis Phenyl 250*4.6 5 μ m у різних співвідношеннях етанол-вода.

Отже, на колонці Ascentis Phenyl, яка має фенільну нерухому фазу, спостерігається збільшення факторів утримання k_{NDMA} та k_{NDEA} зі зниженням концентрації розчинника (рис.3.2). Це зростання пов'язане з підсиленням взаємодій сполук із фенільними групами стаціонарної фази через π - π -взаємодії, диполь-диполь взаємодії та гідрофобні ефекти. Фактор утримання k_{NDEA} зростає значно швидше, ніж k_{NDMA} , що свідчить про вищу спорідненість NDEA до стаціонарної фази. Це може бути пов'язано з її більшою полярністю або здатністю до інтенсивніших π - π -взаємодій із фенільними групами. Натомість NDMA, через слабші взаємодії, утримується менш ефективно. Таким чином, колонка Ascentis Phenyl та Discovery HS F5 250*4.6 5 μ m (SiO₂-PPF) мають схожі результати.

3. Discovery HS C18 250*4.6 5mkmg

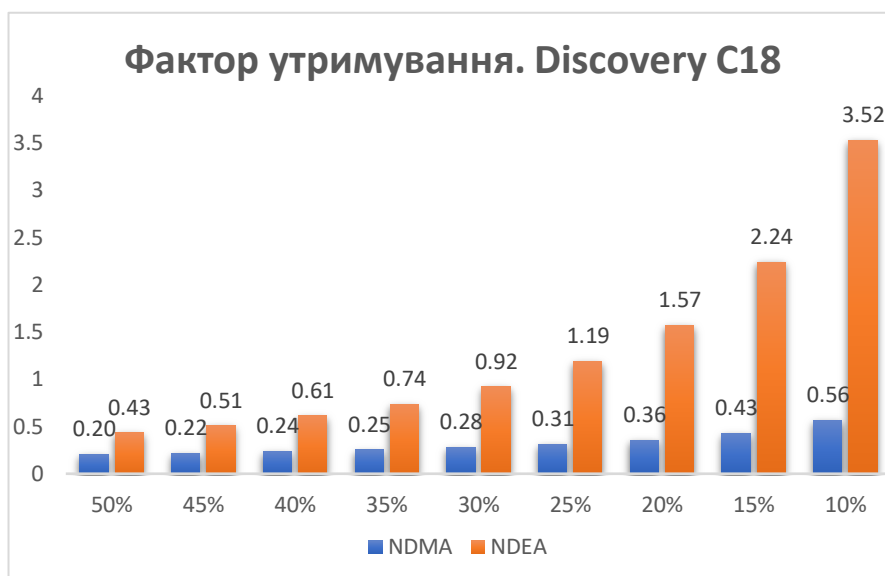


Рисунок 3.3. Фактор утримання NDEA та NDMA на колонці Discovery HS C18 250*4.6 5mkmg у різних співвідношеннях етанол-вода

Отже, на колонці Discovery C18, яка має нерухома фаза на основі октадецилсилільної групи (C18), спостерігається поступове збільшення факторів утримання k_{NDMA} та k_{NDEA} зі зменшенням концентрації органічного розчинника в рухомій фазі зображено на (рис 3.3). Це свідчить про підсилення гідрофобних взаємодій між аналізованими сполуками та нерухома фаза. Фактор утримання k_{NDEA} зростає значно швидше, ніж k_{NDMA} , що вказує на сильнішу спорідненість NDEA до гідрофобної фази, ймовірно, через більшу гідрофобність цієї молекули. NDMA має менший фактор утримання, що обумовлено його менш вираженими гідрофобними властивостями. Отже, колонка Discovery C18 відрізняється від фенільної і пентафторфенільної тим, що їй характерне менше утримування аналітів. А це в свою чергу дає змогу досягати однакових величин утримування за різного вмісту органічного компоненту в рухомій фазі. Так, наприклад, на SiO₂-C18 при 20 % вмісту етанолу фактори утримування для NDEA і NDMA складають 0,36 і 1,57 відповідно, тоді як на SiO₂-Phenyl щоб досягнути таких факторів

утримування необхідно збільшувати вміст етанолу в рухомій фазі до 35-40%. Іонізація і інтенсивність сигналу в мас-детекторі залежить від вмісту органічного компонента в рухомій фазі. Тому дослідивши вплив вмісту етанолу в рухомій фазі ми можемо більш коректно вибрати нерухому фазу для забезпечення максимальної інтенсивності сигналу.

3.2. Результати параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики.

Вибір органічного розчинника

3.2.1. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-метанол = 80 - 20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, SE – енергія в камері зіткнень подані в (табл 3.1).

	75,10→ 43,10	75,10→ 58,10
1	-14,0 keV	-11,0 keV
E	-19,0 keV	-16,0 keV
3	-16,0 keV	-22,0 keV

Табл. 3.1. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ і зображені на у вигляді діаграми на (рис. 3.4) та у вигляді таблиці в Додатку 1.

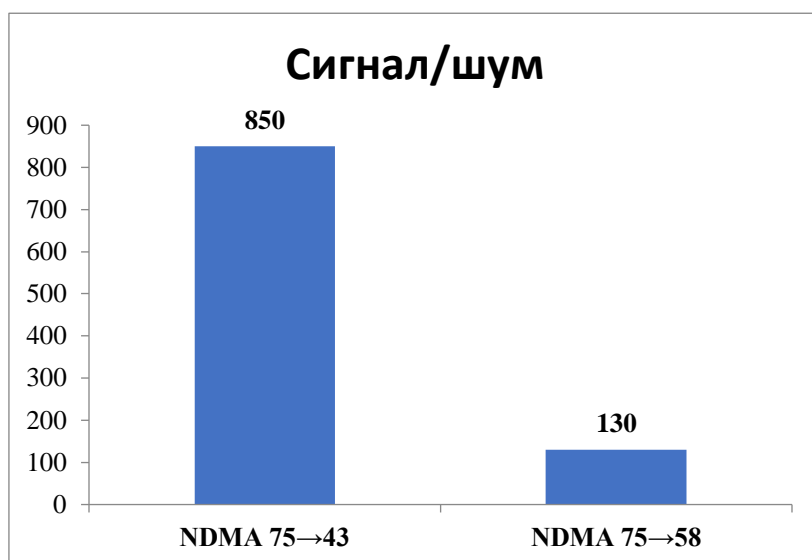


Рис. 3.4. Співвідношення сигнал/шум при виборі органічного розчинника для NDMA при русі фази $H_2O-MeOH$ (80:20)

3.2.2 Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%) = 80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл 3.2).

	75,10→43,10	75,10→58,10
Q1	-28,0 keV	-12,0 keV
CE	-16,0 keV	-12,0 keV
Q3	-17,0 keV	-26,0 keV

Табл. 3.2. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.5) та у вигляді таблиці в Додатку 2.

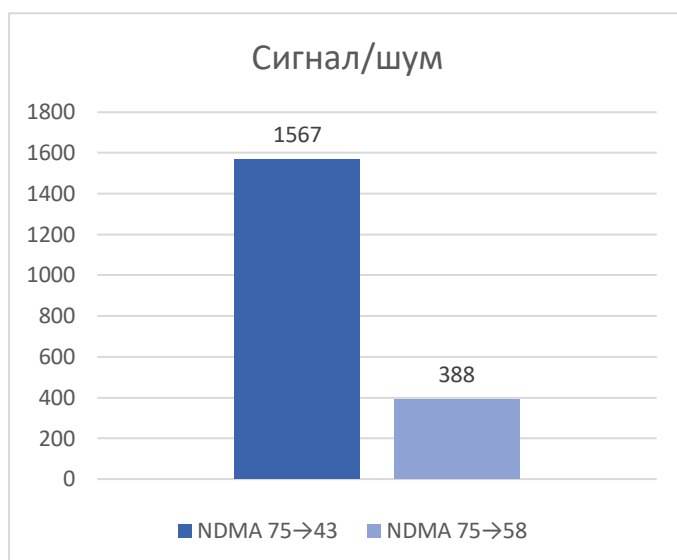


Рис. 3.5. Співвідношення сигнал/шум при виборі органічного розчинника для NDMA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

Отже, при використанні етанолу в якості розчинника для визначення NDMA така важлива характеристика, як співвідношення сигнал до шуму покращується в 3 рази для переходу 75,10→43,10 і в 1,8 рази для переходу 75,10→58,10. Це означає, що при використанні етанолу в якості розчинника можна покращити межу кількісного визначення.

3.2.3 Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-метанол=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,00 103,10→29,00
103,10→47,00

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл 3.3).

	103,10→75,00	103,10→29,00	103,10→47,00
Q1	-24,0 keV	-10,0 keV	-19,0 keV
CE	-12,0 keV	-14,0 keV	-19,0 keV
Q3	-28,0 keV	-11,0 keV	-20,0 keV

Табл. 3.3. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектівано розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.6) та у вигляді таблиці в Додатку 3.

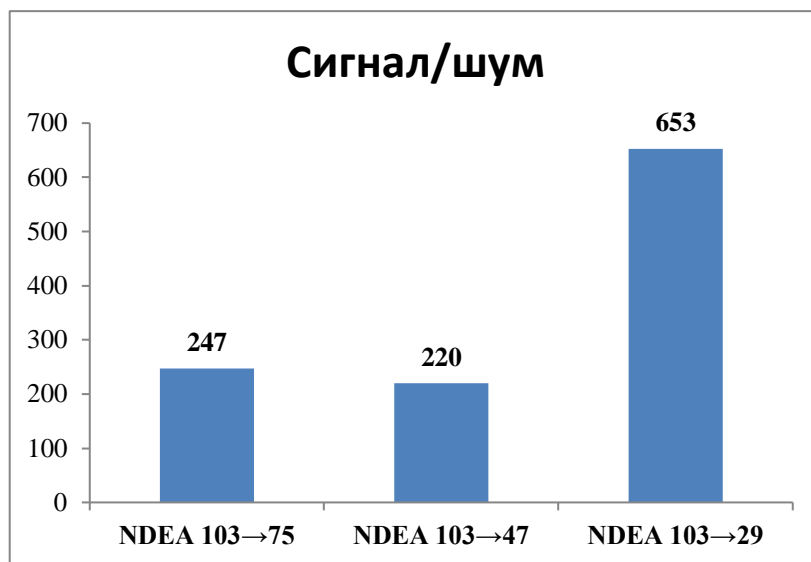


Рис. 3.6. Співвідношення сигнал/шум при виборі органічного розчинника для NDEA при русі фази H₂O-MeOH (80:20)

3.2.4 Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,00 103,10→29,20
103,10→47,00

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл 3.4).

	103,10→75,00	103,10→29,20	103,10→47,00
Q1	-28,0 keV	-11,0 keV	-11,0 keV
CE	-16,0 keV	-15,0 keV	-17,0 keV
Q3	-29,0 keV	-11,0 keV	-21,0 keV

Табл. 3.4. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено вигляді діаграми на (рис. 3.7) та у вигляді таблиці в Додатку 4.

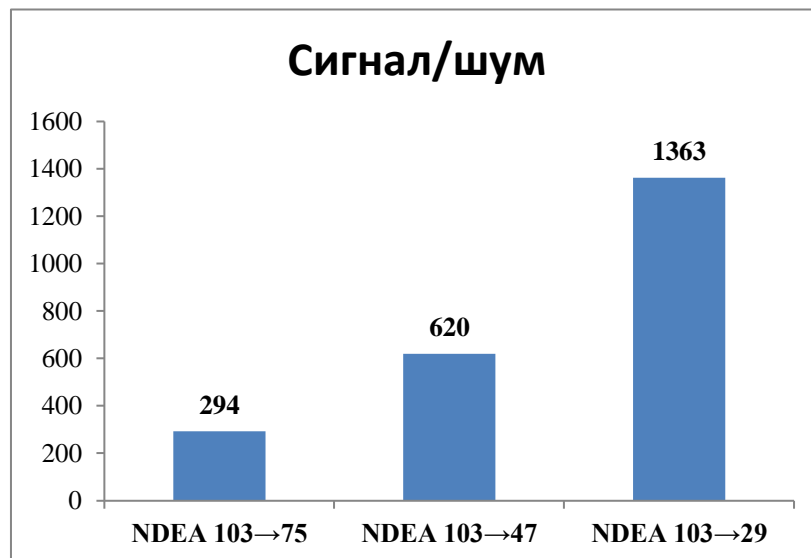


Рис. 3.7. Співвідношення сигнал/шум при виборі органічного розчинника для NDEA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

Отже, при використанні етанолу в якості розчинника для визначення NDEA така важлива характеристика, як співвідношення сигнал до шуму покращується в 2 рази для переходу 103,10→29,20 і в 2,8 рази для переходу 103,10→47,00. Це означає, що при використанні етанолу в якості розчинника можна покращити межу кількісного визначення.

3.3. Результати параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики.

Вибір % вмісту етанолу в рухомій фазі.

3.3.1. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=90-10

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,20

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл 3.5).

	75→43	75→58
Q1	-13,0 keV	-13,0 keV
CE	-18,0 keV	-17,0 keV
Q3	-18,0 keV	-22,0 keV

Табл. 3.5. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображені вигляді діаграми на (рис. 3.8) та таблиці в Додатку 5.

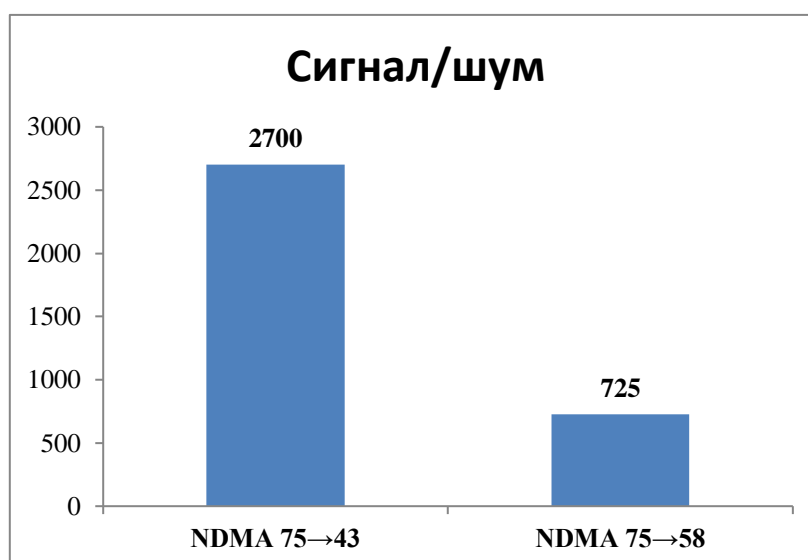


Рис. 3.8. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (90:10)

3.3.2. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,20

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.6).

	75→43	75→58
Q1	-13,0 keV	-12,0 keV
CE	-19,0 keV	-17,0 keV
Q3	-18,0 keV	-11,0 keV

Табл. 3.6. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено вигляді діаграми на (рис. 3.9) та таблиці в Додатку 6.

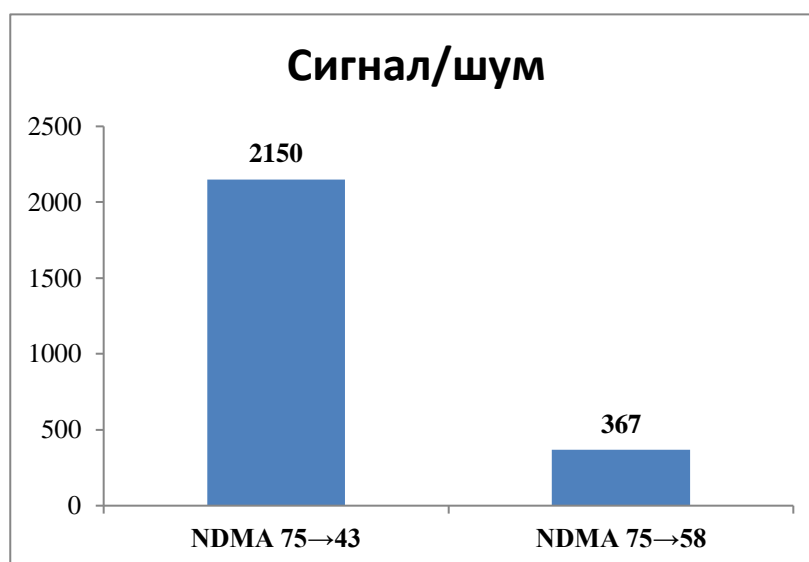


Рис. 3.9. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

3.3.3. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=70-30

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.7).

	75→43	75→58
Q1	-12,0 keV	-28,0 keV
CE	-18,0 keV	-8,0 keV
Q3	-17,0 keV	-21,0 keV

Табл. 3.7. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено вигляді діаграми на (рис. 3.10) та таблиці в Додатку 7.

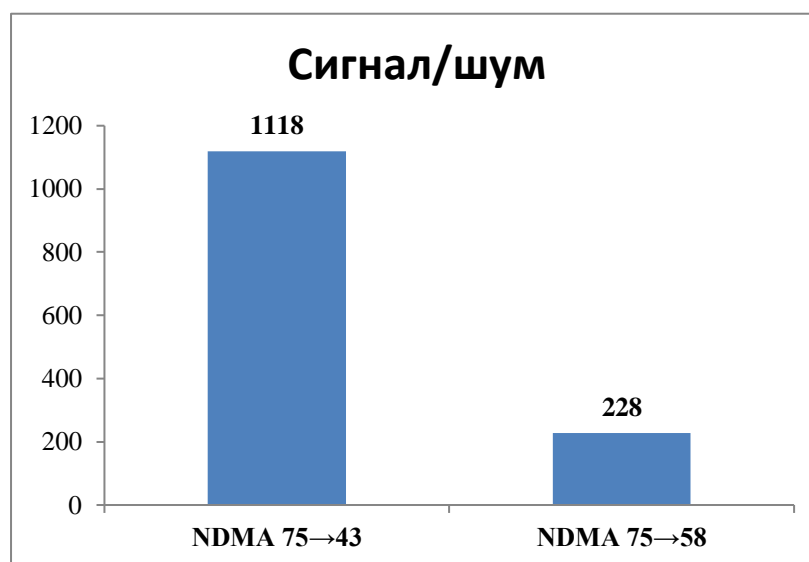


Рис. 3.10. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (70:30)

3.3.4. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=60-40

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,00 75,10→58,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.8).

	75→43	75→58
Q1	-12,0 keV	-27,0 keV
CE	-17,0 keV	-16,0 keV
Q3	-17,0 keV	-24,0 keV

Табл. 3.8. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено вигляді діаграми на (рис. 3.11) та таблиці в Додатку 8.

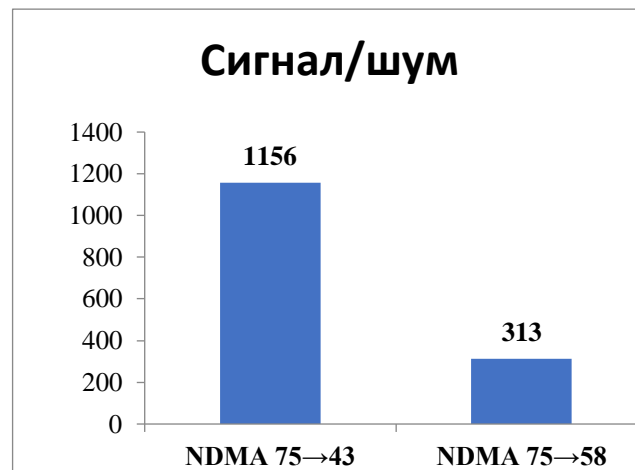


Рис. 3.11. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (60:40)

Очевидно, що при збільшенні вмісту етанолу в рухомій фазі співвідношення сигнал до шуму для NDMA знижується, що вказує на те, що при розробці методики треба орієнтуватися на вміст етанолу в рухомій фазі 20%, рекомендується дослідити співвідношення вода-метанол 90-10, результати зібрано і зображено у вигляді діаграми на (рис.3.12) та таблиці в Додатку 9.

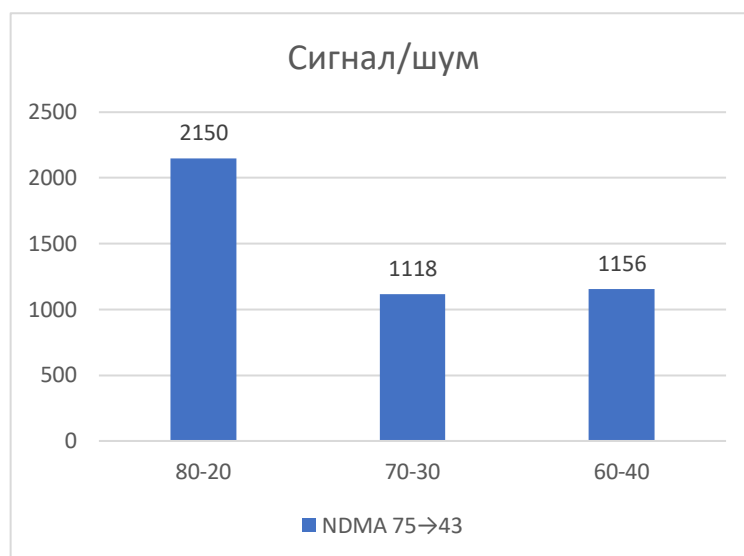


Рис. 3.12. Підсумкове значення співвідношення сигнал/шум при різних співвідношеннях води і етанолу(96%)

3.3.5. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=90-10

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,20
103,10→47,00

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.9).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-18,0 keV	-12,0 keV	-11,0 keV
CE	-13,0 keV	-17,0 keV	-19,0 keV
Q3	-30,0 keV	-11,0 keV	-22,0 keV

Табл. 3.9. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 \cdot \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.13) та таблиці в Додатку 10.

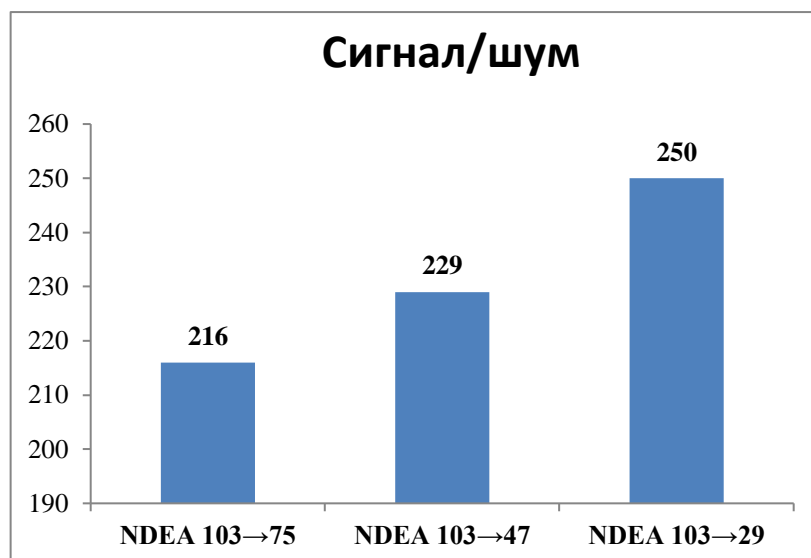


Рис. 3.13. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDEA при русі фази H₂O-MeOH (90:10)

3.3.6. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,20 103,10→29,10
103,10→47,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.10).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-20,0 keV	-16,0 keV	-19,0 keV
CE	-13,0 keV	-16,0 keV	-18,0 keV
Q3	-28,0 keV	-12,0 keV	-17,0 keV

Табл. 3.10. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.14) та таблиці в Додатку 11.

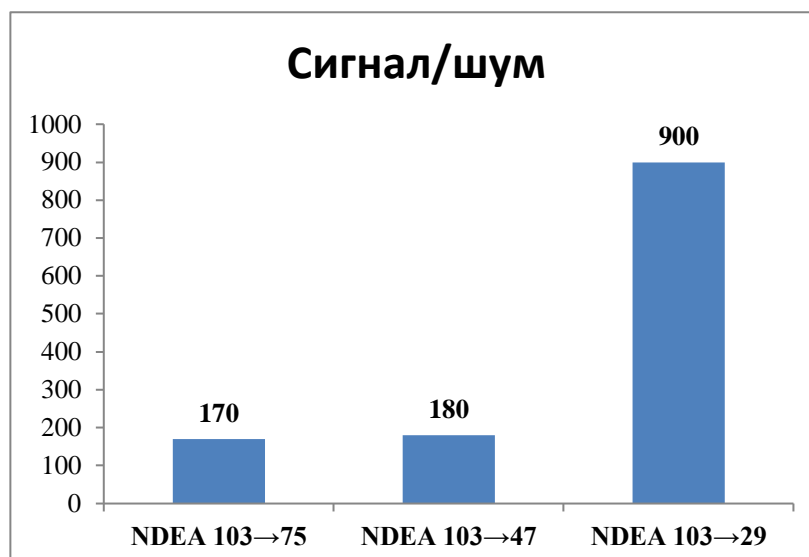


Рис. 3.14. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-МеОН (80:20)

3.3.7. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=70-30

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,10
103,10→47,00

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.11).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-18,0 keV	-11,0 keV	-18,0 keV
CE	-12,0 keV	-20,0 keV	-17,0 keV
Q3	-27,0 keV	-29,0 keV	-19,0 keV

Табл. 3.11. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 \cdot \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.15) та таблиці в Додатку 12.

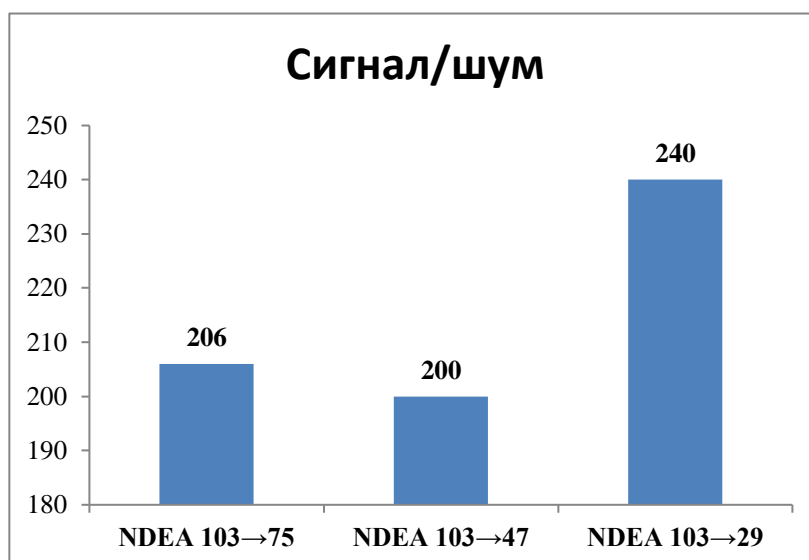


Рис. 3.15. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-MeOH (70:30)

3.3.8. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол(96%)=60-40

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,20 103,10→29,20
103,10→47,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.12).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-10,0 keV	-11,0 keV	-11,0 keV
CE	-11,0 keV	-29,0 keV	-19,0 keV
Q3	-16,0 keV	-30,0 keV	-17,0 keV

Табл. 3.12. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 \cdot \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.16) та таблиці в Додатку 13.

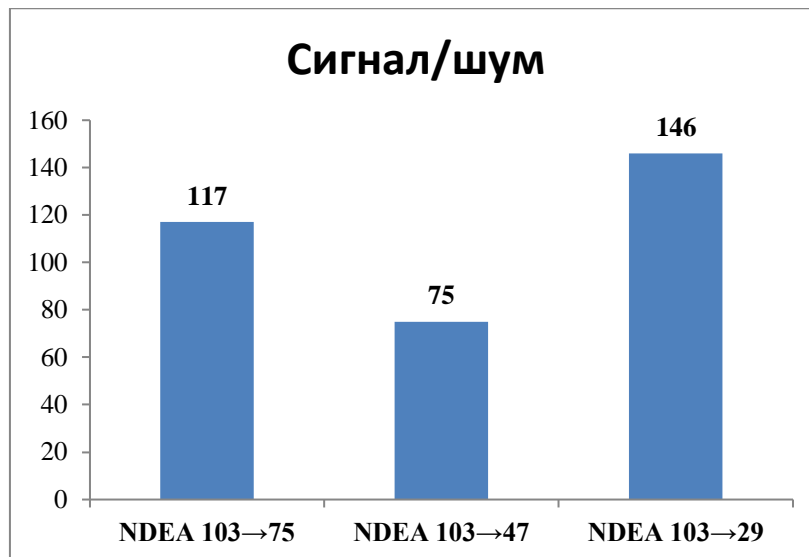


Рис. 3.16. Співвідношення сигнал/шум при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDEA при русі фази H₂O-MeOH (60:40)

Очевидно, що при збільшенні вмісту етанолу в рухомій фазі співвідношення сигнал до шуму для NDEA знижується, що вказує на те, що при розробці методики треба орієнтуватися на вміст етанолу в рухомій фазі 20%, рекомендується дослідити співвідношення вода-метанол 90-10, дані результати зображені у вигляді діаграми на (рис. 3.17) та таблиці в Додатку 14.

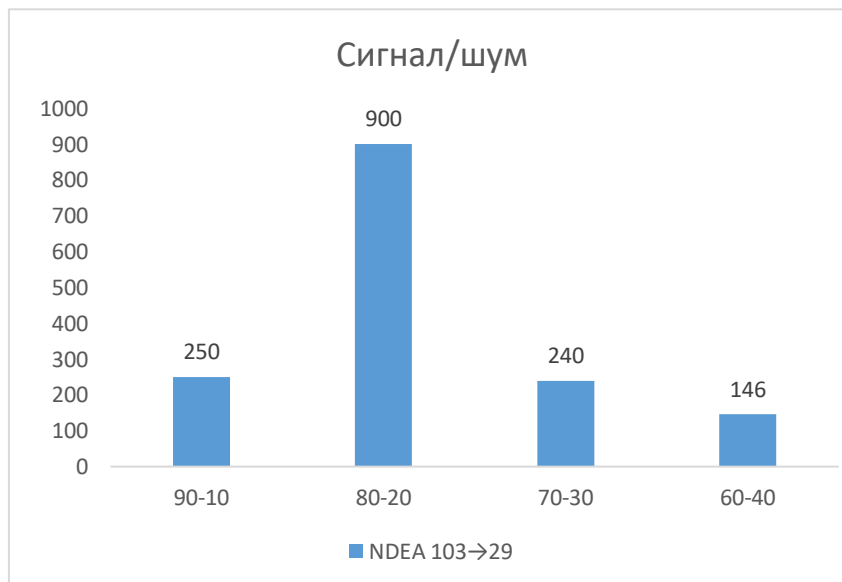


Рис. 3.17. Підсумкове значення співвідношення сигнал/шум при різних співвідношеннях води і етанолу(96%) для NDEA

3.4. Результати параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%)=80-20.

Вибір компонента рухомої фази води чи мурашина кислота.

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→58,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.13).

	75→43	75→58
Q1	-14,0 keV	-18,0 keV
CE	-20,0 keV	-17,0 keV
Q3	-16,0 keV	-24,0 keV

Табл. 3.13. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.18) та таблиці в Додатку 15.

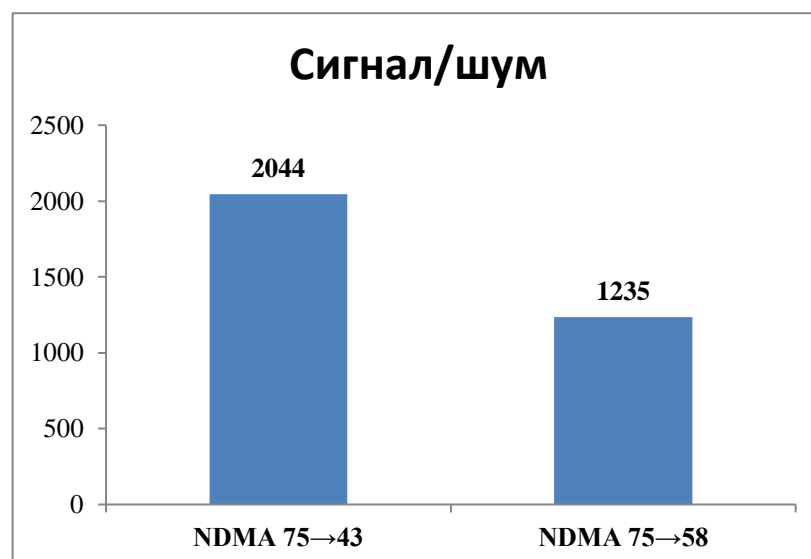


Рис. 3.18. Співвідношення сигнал/шум при виборі компонента рухомої фази H₂O-EtOH (80:20) для визначення NDMA

3.4.1. Оптимізація параметрів для визначення NDMA при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді - етанол(96%)=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→57,90

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.14).

	75→43	75→58
Q1	-14,0 keV	-13,0 keV
CE	-18,0 keV	-10,0 keV
Q3	-16,0 keV	-23,0 keV

Табл. 3.14. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнення

Після оптимізації методу інжектують розчин NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.19) та таблиці в Додатку 16.

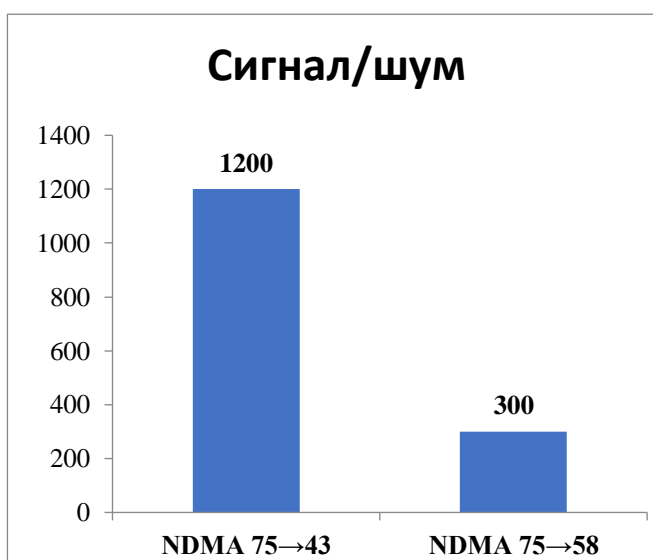


Рис. 3.19. Співвідношення сигнал/шум при виборі компонента рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді – етанол (96%) = 80-20 для визначення NDMA

Отже, при використанні води без добавок в якості компонента рухомої фази для визначення NDMA така важлива характеристика, як співвідношення сигнал до шуму є вищою, тому немає сенсу використовувати 0,1% мурашину кислоту замість води.

3.4.2. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази вода-етанол (96%)=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,00 103,10→47,10

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.15).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-20,0 keV	-11,0 keV	-11,0 keV
CE	-14,0 keV	-18,0 keV	-17,0 keV
Q3	-29,0 keV	-11,0 keV	-17,0 keV

Табл. 3.15. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.20) та таблиці в Додатку 17

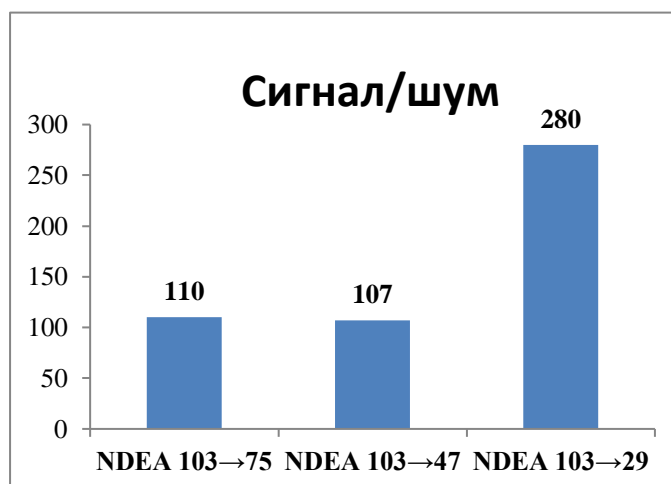


Рис. 3.20. Співвідношення сигнал/шум при виборі компонента рухомої фази H₂O-EtOH (80:20) для визначення NDEA

3.4.3. Оптимізація параметрів для визначення NDEA при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді – етанол(96%)=80-20

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,20
103,10→47,00

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.16).

	103→75	103→29	103→47
Q1	-20,0 keV	-18,0 keV	-24,0 keV
CE	-13,0 keV	-15,0 keV	-18,0 keV
Q3	-27,0 keV	-11,0 keV	-18,0 keV

Табл. 3.16. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.19) та таблиці в Додатку 18.

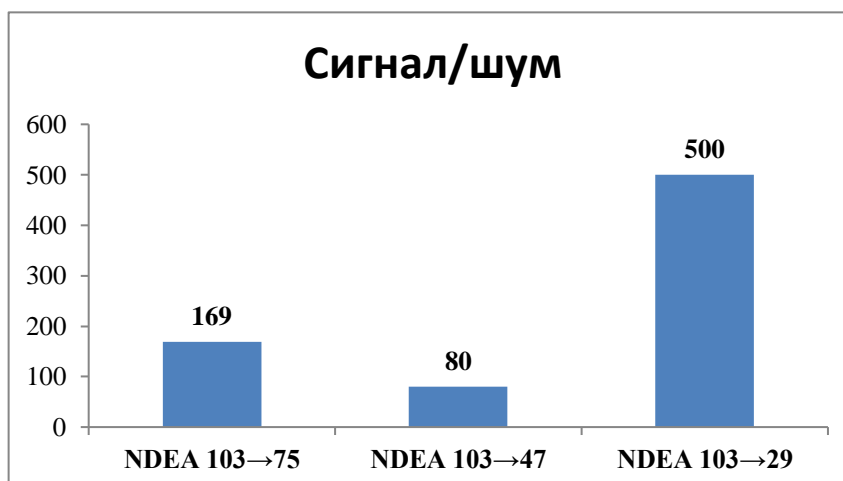


Рис. 3.19. Співвідношення сигнал/шум при виборі компонента рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді – етанол (96%) = 80-20
для визначення NDEA

Отже, при використанні води без добавок в якості компонента рухомої фази для визначення NDEA така важлива характеристика, як співвідношення сигнал до шуму є дещо нижчою для переходів 103→29 і 103→75, тому є сенс перевірити це в реальних умовах з використанням колонки і якщо це підтвердиться, то для визначення цієї сполуки використовувати 0,1% мурашину кислоту замість води.

3.5. Результати параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики.

Вибір швидкості рухомої фази

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 75,10→43,10 75,10→57,90

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані (табл 3.17).

	75,1→43,1	75,1→58,1
Q1	-14,0 keV	-18,0 keV
CE	-20,0 keV	-17,0 keV
Q3	-16,0 keV	-24,0 keV

Табл. 3.17. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

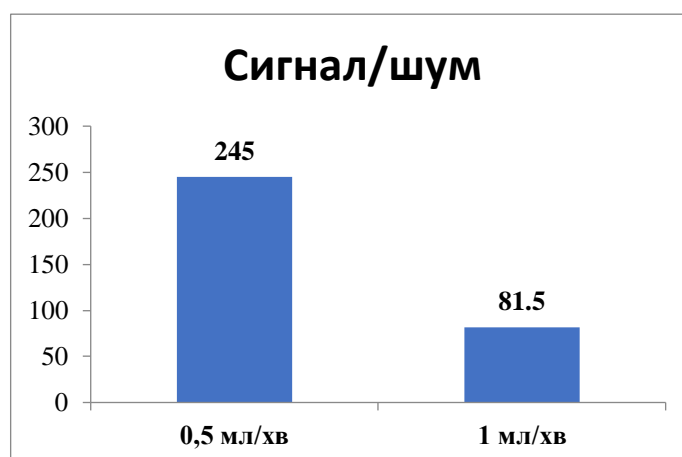


Рис. 3.20. Співвідношення сигнал/шум при виборі швидкості рухомої фази

Отримані дані зображені у вигляді діаграми на (рис. 3.20) та таблиці в Додатку 19, свідчать про те що вибір швидкості потоку є важливою і потребує уточнення при фіналізації методики. Так, при зменшенні швидкості потоку також збільшується час необхідний для хроматографування, тому для того, щоб при зменшенні швидкості потоку час утримування не збільшувався варто розглянути заміну хроматографічної колонки з діаметром 4,6 мм на колонку з діаметром 3 мм або 2 мм.

Наприклад, якщо для колонки з діаметром 4,6 мм встановлено швидкість 1,0 мл/хв, то для колонки з діаметром 3,0 мм аналогічне утримування буде досягнуто за потоку:

$$1,0 \text{ мл/хв} \times 3,0^2 / 4,6^2 = 0,425 \text{ мл/хв}$$

А для колонки з діаметром 2,1 мм

$$1,0 \text{ мл/хв} \times 2,1^2 / 4,6^2 = 0,208 \text{ мл/хв}$$

3.6. Результати параметрів хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики.

Вибір оптимальної швидкості потоку

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,20
103,10→47,00, 75,10→43,10 75,10→57,90

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, SE – енергія в камері зіткнень подані в (табл. 3.18)

	NDMA		NDEA		
MRM	75,1→43,1	75,1→58,1	103,1→75,1	103,1→29	103,1→47
Q1	-14,0 keV	-18,0 keV	-20keV	-11keV	-11keV

CE	-20,0 keV	-17,0 keV	-14keV	-18keV	-17keV
Q3	-16,0 keV	-24,0 keV	-29keV	-11keV	-17keV

Табл. 3.18. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA та NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.21) та таблиці в Додатку 20.

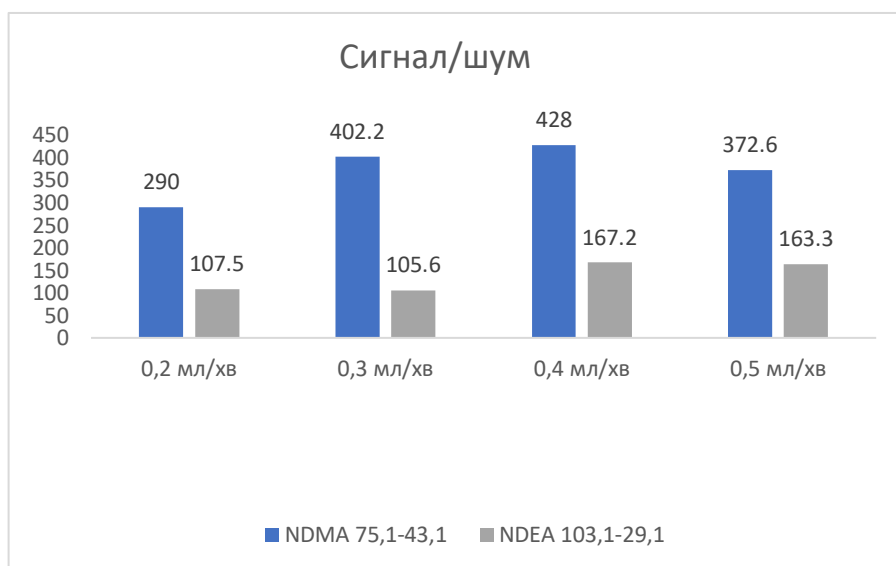


Рис 3.21. Співвідношення сигнал/шум при виборі оптимальної швидкості потоку для визначення NDMA та NDEA

Отже, значення сигналу для NDMA і NDEA змінювалися зі збільшенням швидкості потоку (від 0,2 до 0,5 мл/хв), але оптимальне співвідношення сигнал/шум (S/N) було досягнуто для кожної речовини при різних швидкостях потоку. Для NDMA найкраще співвідношення сигнал/шум спостерігалось при швидкості 0,4 мл/хв, що вказує на оптимальні умови для його визначення. Для NDEA найвищий сигнал/шум також спостерігався при 0,4 мл/хв, і хоча сигнал зріс на 0,5 мл/хв, шум також збільшився, таким чином знижуючи ефективність вимірювання. Таким чином, оптимальна швидкість потоку становить 0,4 мл/хв, оскільки вона забезпечує найкраще співвідношення сигнал/шум для обох видів.

3.7. Результати хроматографічної системи для покращення межі кількісного визначення методики.

Вибір об'єму інжекції

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,20
103,10→47,00, 75,10→43,10 75,10→57,90

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл. 3.19).

	NDMA		NDEA		
MRM	75,1→43,1	75,1→58,1	103,1→75,1	103,1→29	103,1→47
Q1	-14,0 keV	-18,0 keV	-20keV	-11keV	-11keV
CE	-20,0 keV	-17,0 keV	-14keV	-18keV	-17keV
Q3	-16,0 keV	-24,0 keV	-29keV	-11keV	-17keV

Табл. 3.19. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектують розчин NDEA та NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.22) та таблиці в Додатку 21.

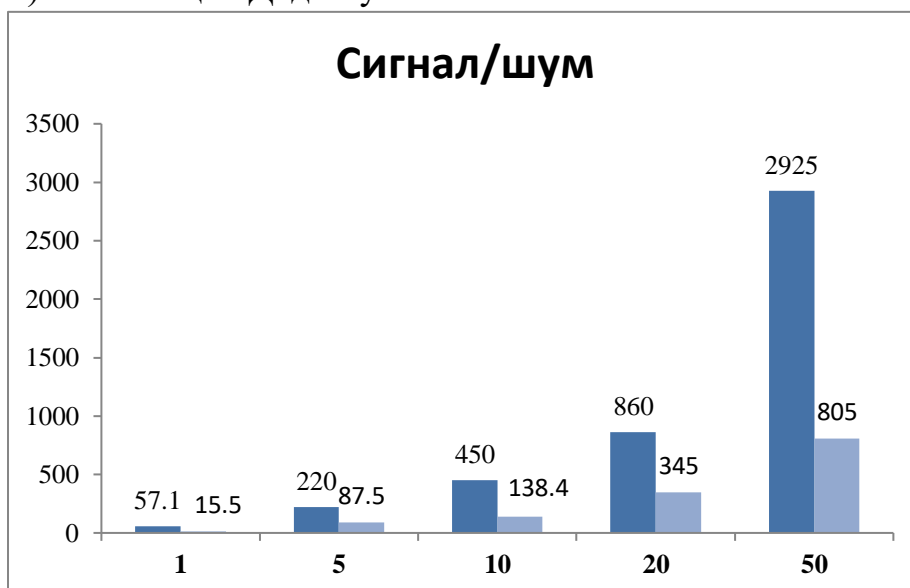


Рис. 3.22. Співвідношення сигнал/шум при виборі об'єму інжекції для визначення NDMA та NDEA

Отже, зі збільшенням об'єму інжекції сигнали як NDMA, так і NDEA збільшуються, а також покращується співвідношення сигнал/шум (S/N). Однак, порівняно з NDEA, NDMA продемонстрував вищі значення S/N, що вказує на кращу чутливість і точність виявлення. Це може означати, що NDMA легше ідентифікувати за цих умов аналізу.

3.8. Результати параметрів для визначення при використанні рухомої фази 0.1% мурашина кислота у воді - етанол(96%)=80-20.

Оптимізація переходів

Оптимальні переходи встановлено такі: 103,10→75,10 103,10→29,20
103,10→47,00, 75,10→43,10 75,10→57,90

Оптимальні енергії Q1, Q3 – енергії першого і третього квадруполя, CE – енергія в камері зіткнень подані в (табл. 3.20).

	NDMA		NDEA		
	75,1→43,1	75,1→58,1	103,1→75,1	103,1→29	103,1→47
MRM	75,1→43,1	75,1→58,1	103,1→75,1	103,1→29	103,1→47
Q1	-14,0 keV	-18,0 keV	-20keV	-11keV	-11keV
CE	-20,0 keV	-17,0 keV	-14keV	-18keV	-17keV
Q3	-16,0 keV	-24,0 keV	-29keV	-11keV	-17keV

Табл. 3.20. Оптимальні енергії та енергія в камері зіткнень

Після оптимізації методу інжектровано розчин NDEA та NDMA і визначено величину сигналу (S), шуму (N) і величину їх співвідношення, що порахована за формулою $S/N = 2 * \text{Сигнал} / \text{Шум}$ та зображено у вигляді діаграми на (рис. 3.23) та таблиці в Додатку 22.

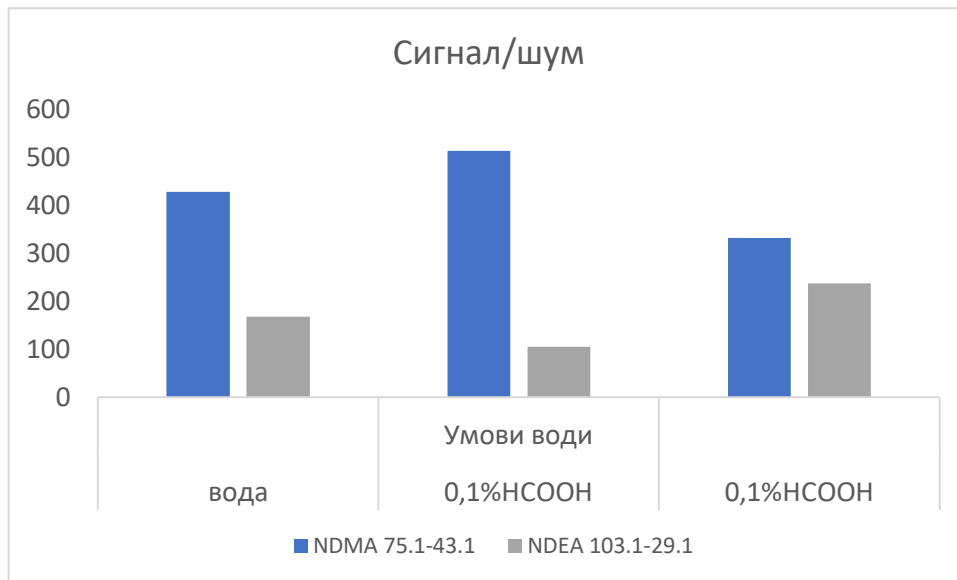


Рис. 3.23. Співвідношення сигнал/шум при удосконаленні умов рухомої фази для визначення NDMA та NDEA

Отже, під час перевірки в реальних умовах з використанням колонки, можна зробити висновок. Для визначення NDMA результати показали, що співвідношення сигналу до шуму є зависокими, тому використовувати 0,1% мурашину кислоту є не доцільним. А для визначення NDEA, можна підсумувати, що під час проведення експерименту на об'єктах дослідження, використання 0,1% мурашиної кислоти є досить ефективним.

3.9. Результати хроматографування в Sample A та Sample B.

Хроматограми стандартного зразку – 2,5 нг/мл (рис. 3.24-3.25)

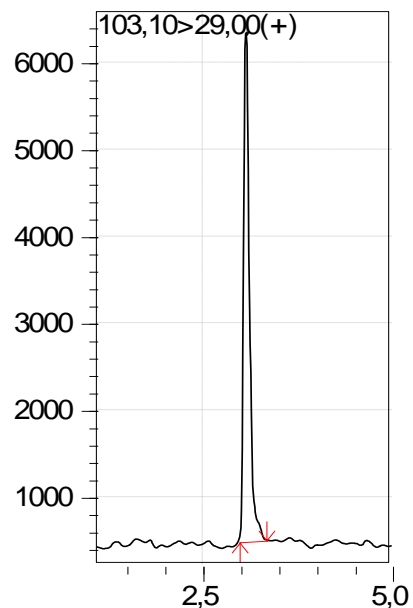
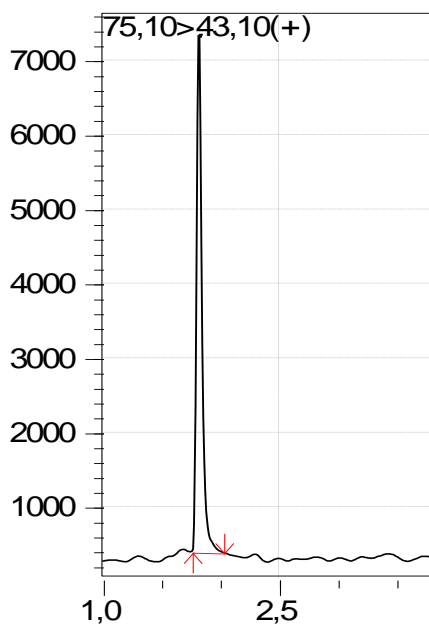


Рис. 3.24. Хроматограма NDMA

Рис. 3.25. Хроматограма NDEA

Sample A1			Sample B1		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	13235,00	172,6	1	17264,00	197,03
2	14298,00	183,6	2	18907,00	212,62
	SD	7,75		SD	11,02
	Mean	178,12		Mean	204,83
Sample A2			Sample B2		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	16971,00	191,5	1	13863,00	201,90
2	16007,00	182,4	2	14462,00	208,87
	SD	6,38		SD	4,93
	Mean	186,95		Mean	205,39
Sample A3			Sample B3		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	10801,00	153,0	1	17474,00	200,12
2	10418,00	148,9	2	18225,00	207,28
	SD	2,90		SD	5,07
	Mean	150,93		Mean	203,70

Табл. 3.21. Вміст NDMA в зразку А та В.

У проведеному дослідженні було виявлено, що середнє значення вмісту NDMA в Sample A становить 172 нг/г, тоді як у Sample B цей показник виявився вищим і склав 204.64 нг/г. Це свідчить про те, що другий зразок містить значно більше NDMA, що може бути важливим фактором для

подальшого аналізу та оцінки ризиків, пов'язаних із впливом цього з'єднання на здоров'я.

Sample A1			Sample B1		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	15311,00	150,7	1	8271,00	97,89
2	16250,00	156,6	2	9315,00	103,93
	SD	4,18		SD	4,27
	Mean	153,67		Mean	100,91
Sample A2			Sample B2		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	17293,00	147,9	1	5266,00	98,65
2	17903,00	151,4	2	5092,00	97,41
	SD	2,46		SD	0,87
	Mean	149,69		Mean	98,03
Sample A3			Sample B3		
	S,mAu*s	ng/g		S,mAu*s	ng/g
1	15161,00	155,3	1	7086,00	91,53
2	15659,00	158,6	2	6302,00	86,97
	SD	2,30		SD	3,23
	Mean	156,93		Mean	89,25

Табл. 3.22. Вміст NDEA в зразку А та В

За результатами визначення вмісту NDEA у досліджуваних зразках, встановлено, що у Sample А середнє значення вмісту становить 153,4 нг/г, тоді як у Sample В — 96,06 нг/г. Отримані значення свідчать про варіативність вмісту цієї сполуки в залежності від характеристик зразків, що

може бути зумовлено різними умовами зберігання, джерелами забруднення або технологічними особливостями.

№	NDMA (µg/kg)						
	Sample A			LOQ	Sample B		
	Assay 1	Assay 2	Assay 3		Assay 1	Assay 2	Assay 3
1.	218	198	206	10,0	305	256	266
2.	246.6	254.5	n.r.	206.3	287.65	280.08	n.r.
3.	239	217	237	20	297	293	314
№	NDEA (µg/kg)						
	Sample A			LOQ	Sample B		
	Assay 1	Assay 2	Assay 3		Assay 1	Assay 2	Assay 3
1.	119	110	122	10.0	68.3	62.6	68.9
2.	190.2	171.7	n.r.	109.0	109.69	107.46	n.r.
3.	126	126	119	20	70.6	71.7	67.8

Табл. 3.23. Результати дослідження Sample A та B іншими лабораторіями.

Отримані результати дослідження вмісту нітрозамінів у лаках свідчать про наявність даних сполук у концентраціях, які можуть варіюватися. Порівняння отриманих даних із результатами інших лабораторних досліджень, засвідчує відповідність загальним тенденціям щодо наявності нітрозамінів у аналогічних матеріалах. Разом з тим, у деяких випадках спостерігається відмінність у кількісних показниках, що може бути пов'язано з різними методиками аналізу, джерелами сировини та технологічними процесами виготовлення лаків. Отже, результати даного дослідження доповнюють наявні дані та підкреслюють необхідність подальшого моніторингу вмісту нітрозамінів у матеріалах.

3.10. Результати методу стандартних добавок Sample A

	Area	ng/50 mg sample	minus Add0	addition	recovery, %	weight
Sample A Add 1	15442	8,01				49,2
Sample A Add 2	23659	12,38	4,37	5,00	87,40	47,68
Sample A Add 3	33984	17,87	9,86	10,00	98,61	48,91
Sample A Add 4	39451	20,78	12,77	15,00	85,13	54,01
Sample A Add 5	47195	24,90	16,89	20,00	84,44	52,39
Sample A Add 6	54856	28,97	20,96	25,00	83,85	54,83

Табл. 3.24. Результати NDMA в Sample A.

У даному дослідженні застосовано метод стандартних добавок для кількісного визначення NDMA та NDEA у зразках. Методика дозволяє оцінити точність та відтворюваність вимірювань шляхом додавання відомих кількостей стандарту та аналізу отриманих сигналів. Метод стандартного додавання ґрунтується на тому, що в масі наважки контрольної суміші додають точну масу наважки аналізованої речовини, яка вже міститься в контрольній суміші,

після чого знімають хроматограми вихідної контрольної суміші та контрольної суміші з доданою стандартною добавкою.

Отримані результати вимірювань для NDMA та NDEA представлені у (табл. 3.24-3.25.) та подані у вигляді кривої зображених на (рис. 3.26-3.27.) Параметри дослідження включають номінальну концентрацію стандарту, вимірний аналітичний сигнал, відхилення від прогнозованого значення та похибку методу.

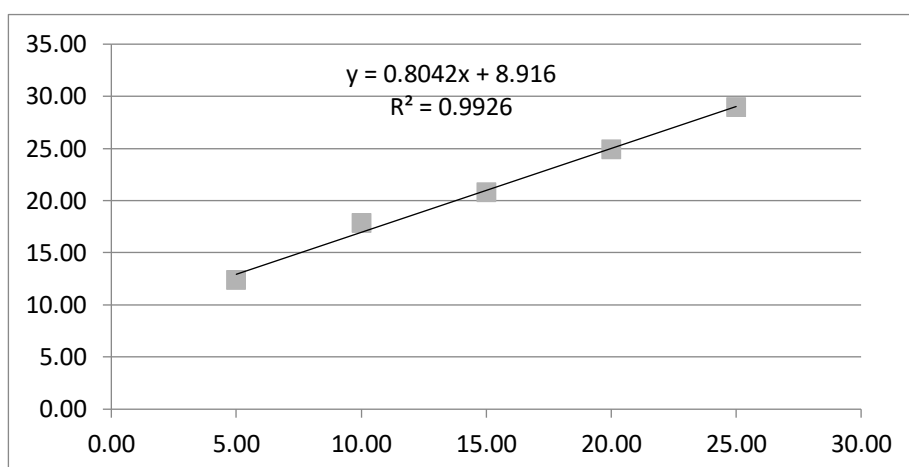


Рис. 3.26. Крива методу стандартних добавок NDMA для Sample A

	Area	ng/50 mg sample	minus Add0	addition	recovery, %	weight
Sample A Add 1	17340	6,74				49,2
Sample A Add 2	30480	11,74	5,00	5,00	99,98	47,68
Sample A Add 3	48457	18,58	11,84	10,00	118,39	48,91
Sample A Add 4	60807	23,28	16,54	15,00	110,25	54,01

Sample A						
Add 5	73631	28,16	21,42	20,00	107,08	52,39
Sample A						
Add 6	89147	34,06	27,32	25,00	109,28	54,83

Табл. 3.25. Результати для NDEA в зразку А

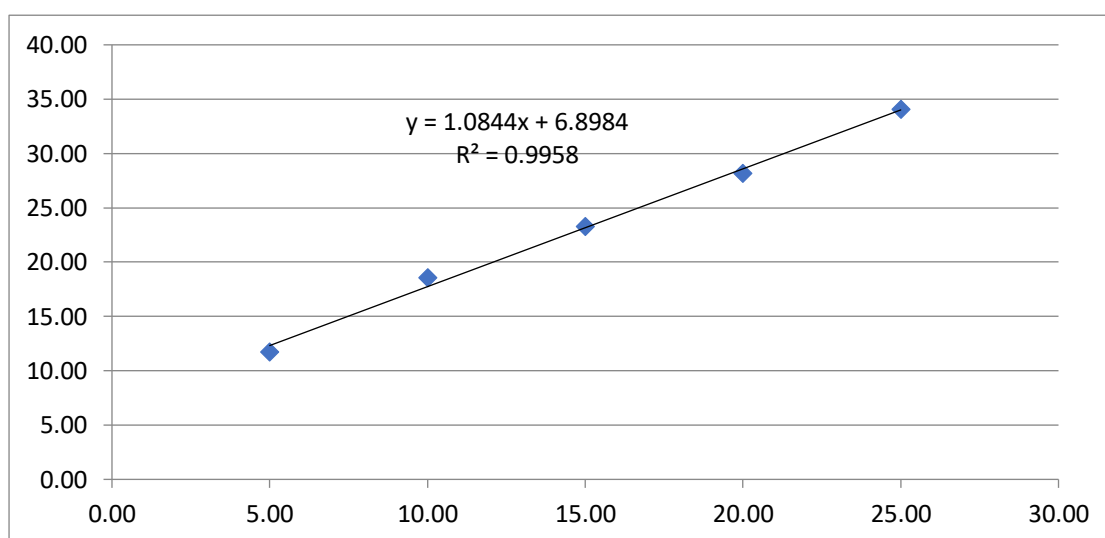


Рис. 3.27. Крива методу стандартних добавок NDEA для Sample A

Аналіз похибки показує, що метод стандартних добавок забезпечує високу точність визначення NDMA та NDEA, оскільки відносна похибка не перевищує 5%. Відхилення (r) свідчить про гарну відповідність між прогнозованими та експериментальними даними. Невеликі варіації можуть бути пов'язані з експериментальними умовами або чутливістю приладу.

3.11. Результати методу добавок Sample B

Для Sample B також було проведено дослідження методу стандартних добавок. Результати дослідження подані в таблиці та зображені на рис.

	Area	ng/50 mg sample	minus Add0	addition	recovery, %	weight

Sample B Add 1	16228	7,58				52,1
Sample B Add 2	24773	12,38	4,80	5,00	95,97	49,0
Sample B Add 3	34001	17,56	9,98	10,00	99,80	51,3
Sample B Add 4	40635	21,29	13,71	15,00	91,37	56,4
Sample B Add 5	49198	26,09	18,51	20,00	92,57	52,1
Sample B Add 6	58000	31,04	23,46	25,00	93,83	49,7

Табл. 3.26. Результати для NDMA в Sample B

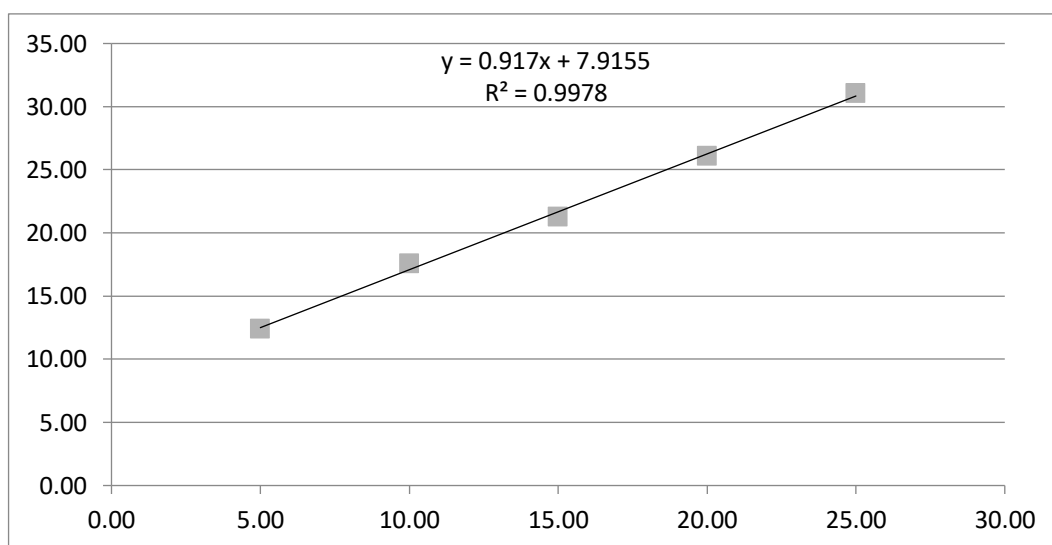


Рис. 3.28. Крива методу стандартних добавок NDMA для Sample B

	Area	ng/50 mg sample	minus Add0	addition	recovery, %	weight
Sample B Add 1	6842	0,16				52,1
Sample B Add 2	21153	6,12	5,96	5,00	119,18	49,0
Sample B Add 3	34267	11,58	11,42	10,00	114,20	51,3
Sample B Add 4	45937	16,44	16,28	15,00	108,53	56,4
Sample B Add 5	57424	21,23	21,06	20,00	105,31	52,1
Sample B Add 6	70975	26,87	26,71	25,00	106,82	49,7

Табл. 3.27. Результати для NDEA в Sample B

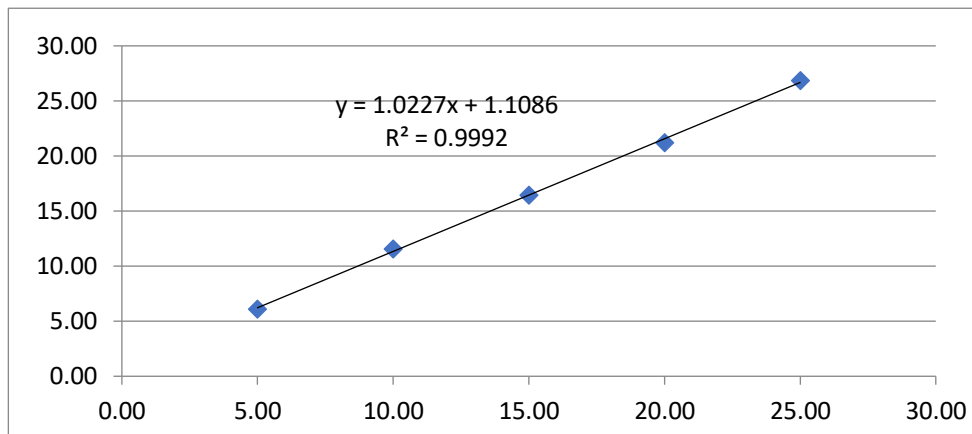


Рис. 3.29. Крива методу стандартних добавок NDEA для Sample B

Метод стандартних добавок виявився ефективним для визначення NDMA та NDEA у зразках. Показана висока точність і відтворюваність результатів, що дозволяє рекомендувати дану методику для кількісного аналізу нітрозамінів у різних матрицях.

3.12. Результати аналізу зразків лаків різного призначення, які доступні на ринку України.

У першому зразку лікувального (протигрибкового) лаку не було виявлено слідів NDMA та NDEA, що свідчить про відсутність цих потенційно небезпечних нітрозамінових сполук у дослідженому матеріалі. Це вказує на відповідність складу зразка вимогам до безпеки та якості продукції.

У Sample 2 було виявлено 124,2 нг/г – NDMA, але взагалі не виявлено NDEA. Кількісний вміст зображений у вигляді хроматограми на (рис. 3.30-3.31.)

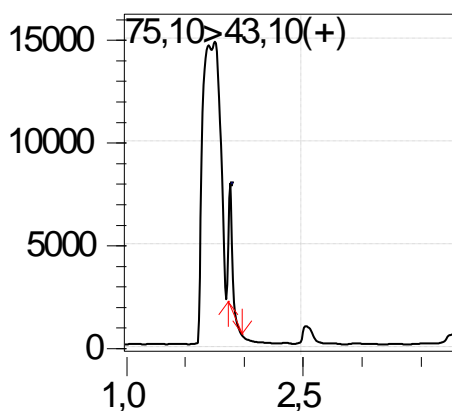


Рис. 3.30. Хроматограма NDMA

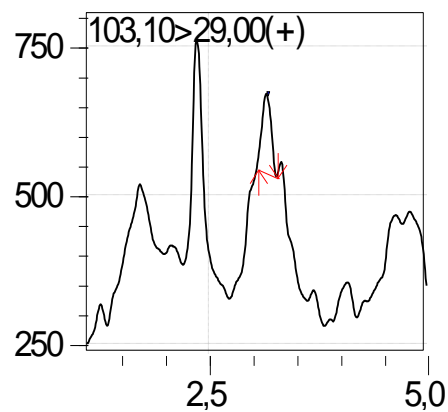


Рис. 3.31. Хроматограма NDEA

У Sample 3 було виявлено 114,90 нг/г – NDMA, а NDEA не було виявлено. Кількісний вміст зображений у вигляді хроматограми на (рис.3.32-3.33).

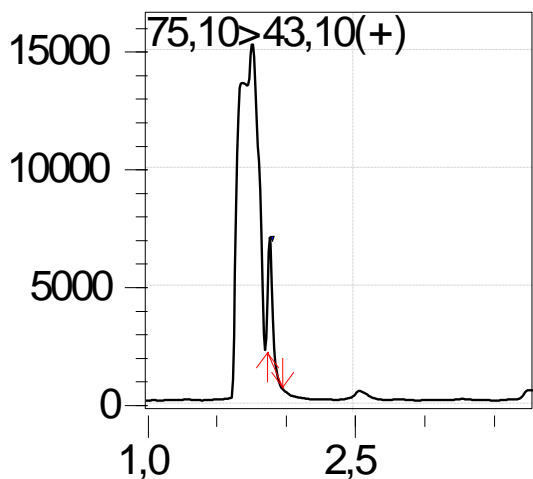


Рис.3.32. Хроматограма NDMA

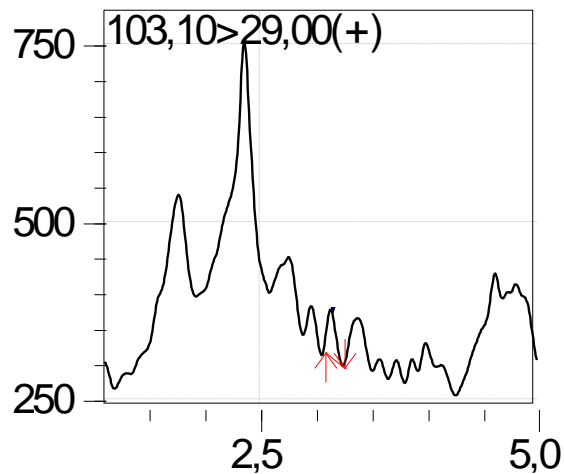


Рис. 3.33. Хроматограма NDEA

У Sample 4, NDMA не було виявлено, а NDEA було виявлено в невеликій кількості – 6,57 нг/г. Кількісний вміст зображений у вигляді хроматограми на рисунку 3.34 – 3.35.

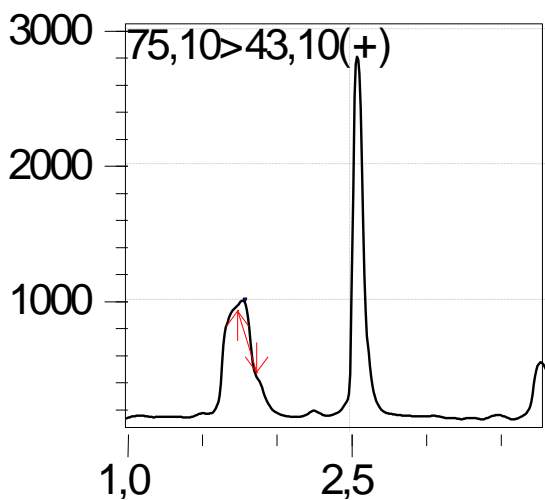


Рис. 3.34. Хроматограма NDEA

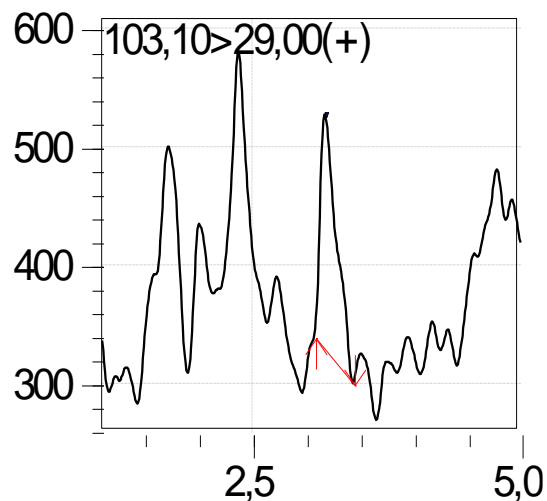


Рис. 3.35. Хроматограма NDEA

РОЗДІЛ 4. ВАЛІДАЦІЯ МЕТОДИКИ ВИЗНАЧЕННЯ ПОЛЯРНИХ НІТРОЗАМІНІВ.

4.1. Лінійність

Було проведено дослідження лінійності аналітичної методики, що є ключовим параметром валідації та характеризує здатність методу забезпечувати прямопропорційну залежність між концентрацією аналіту в досліджуваних зразках і відповідним аналітичним сигналом. Це дослідження здійснювалося в межах заданого діапазону концентрацій з метою підтвердження адекватності та відтворюваності результатів при кількісному визначенні аналіту.

Діапазон концентрацій

З метою оцінки лінійності аналітичної методики було обрано концентраційний діапазон від 1,25 нг/мл до 12,5 нг/мл. Вибір саме цього інтервалу концентрацій зумовлений його репрезентативністю щодо очікуваних рівнів вмісту аналіту у реальних зразках, що, у свою чергу, забезпечує прикладну значущість отриманих результатів лінійності для подальшого практичного застосування методики.

Кількість рівнів концентрацій

Лінійність аналітичної методики була досліджена шляхом проведення вимірювань на 5 рівнях концентрацій аналіту, включаючи нульову точку. Така кількість рівнів є методологічно обґрунтованою та вважається достатньою відповідно до загальноприйнятих підходів валідації, оскільки дозволяє отримати достовірну інформацію щодо характеру залежності між

концентрацією аналіту та інтенсивністю аналітичного сигналу, а також забезпечує можливість виявлення потенційних відхилень від лінійної моделі.

Критерії прийнятності

Для кількісної оцінки лінійності аналітичної методики використовується коефіцієнт кореляції (r), який відображає ступінь відповідності між експериментальними даними та теоретичною лінійною моделлю. Відповідно до встановлених критеріїв прийнятності, значення коефіцієнта кореляції повинно становити не менше 0,999, що свідчатиме про високий рівень лінійної залежності між концентрацією аналіту та аналітичним сигналом.

Окрім того, до параметрів лінійної регресії також висуваються вимоги щодо статистичної значущості вільного члена (y -intersept, a). Згідно з критерієм прийнятності, вільний член не повинен статистично відрізнятися від нуля. Така умова є необхідною для виключення систематичної похибки в результатах та забезпечення точності методу у межах вивченого концентраційного діапазону.

$$a \leq 2 * SD(a)$$

Лінійність методики визначення NDMA

C St нг/мл	S, mAu*s	x_back	bias, %
1.25	12376	1.32	5.8
2.5	22993	2.39	-4.3
5	49185	5.03	0.7
12.5	123230	12.50	0.0

Табл 4.1. Дані для визначення залежності сигналу NDMA від концентрації

a	-738.3	Y intersept
---	--------	-------------

Табл.	b	9917.0	нахил
	a/St5нг/мл	-1.5%	
	SD(a)	707.79	відповідає
	SD(b)	107.37	
	2* SD(a)	1415.59	
	r	1.000	відповідає
	DL	0.236	нг/мл
	QL	0.714	нг/мл

4.2. Результати статистичної обробки даних лінійної залежності $Y=b \cdot X+a$

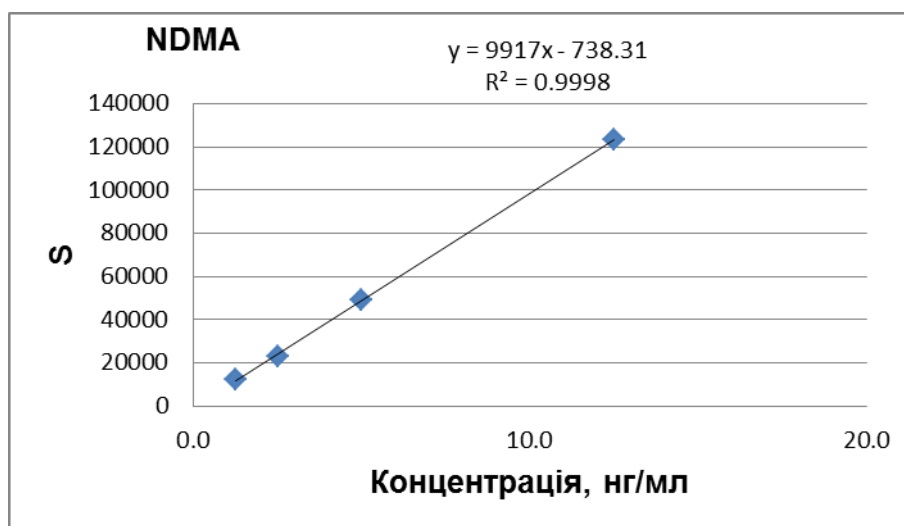


Рис. 4.1. Концентраційна залежність сигналу NDMA.

Значення коефіцієнту кореляції і вільного члена а відповідає встановленим критеріям. У дослідженому концентраційному діапазоні, що охоплює 1,25 нг/мл – 12,5 нг/мл встановлено чітку лінійну залежність між аналітичним сигналом та концентрацією NDMA. Межа кількісного визначення становить 0,714 нг/мл, а межа виявлення 0,236 нг/мл.

C	S,		
St нг/мл	mAu*s	x_back	bias, %
1.25	16342	1.31	4.7

2.5	31533	2.43	-2.7
5	66335	5.00	0.1
12.5	167819	12.51	0.1

Лінійність методики визначення NDEA

Табл.4.3. Дані для визначення залежності сигналу NDEA від концентрації

a	-1356.1	Y intercept
b	13527.2	нахил
a/St5нг/мл	-2.0%	
SD(a)	653.22	відповідає
SD(b)	99.09	
2* SD(a)	1306.43	
r	1.000	відповідає
DL	0.159	нг/мл
QL	0.483	нг/мл

Табл. 4.4. Результати статистичної обробки даних лінійної залежності

$$Y=b \cdot X+a$$

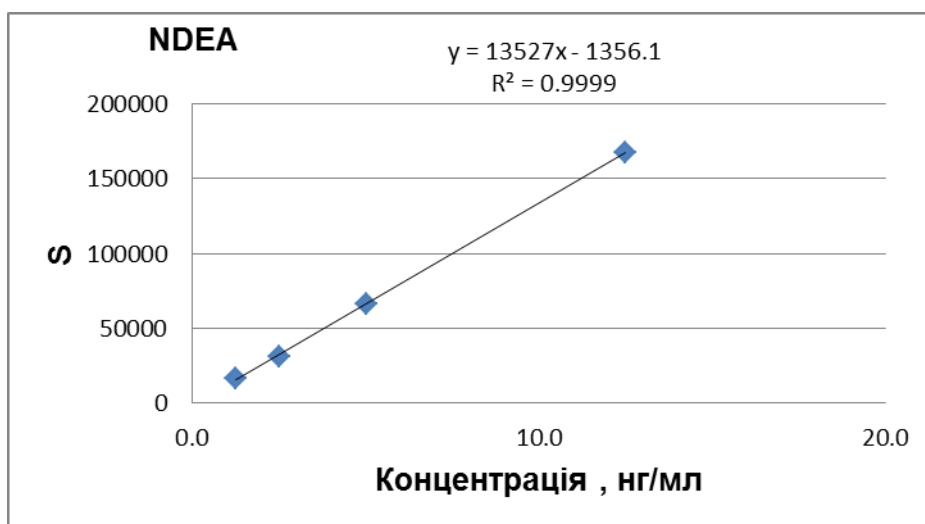


Рис. 4.2. Концентраційна залежність сигналу NDMA.

Значення коефіцієнту кореляції і вільного члена а відповідає встановленим критеріям. У дослідженому концентраційному діапазоні, що охоплює 1,25 нг/мл – 12,5 нг/мл встановлено чітку лінійну залежність між аналітичним сигналом та концентрацією NDMA. Межа кількісного визначення становить 0,483 нг/мл, а межа виявлення 0,159 нг/мл.

4.2. Правильність Sample A

Для визначення правильності методики використовували методи стандартних добавок, коли до реального зразка додають відому кількість речовини, а після визначають кількість цієї речовини.

Для розрахунку правильності використовується наступна формула:

$$Z = (\text{Знайдено} / \text{Введено}) * 100\%$$

де:

- Z - відношення знайденої кількості речовини до введеної кількості, виражене у відсотках;
- Знайдено - кількість речовини, встановлена за допомогою методики;

- Введено - відома кількість речовини, додана до зразка.

Метод стандартних добавок для визначення NDMA в зразку А

	Area	ng/50 mg Знайдено	minus Add1	ng/50 mg Введено	recovery, %
A Add 1 1 002.lcd	15442	8.29			
A Add 2 1 003.lcd	23659	12.50	4.21	5.00	84.20
A Add 3 1 004.lcd	33984	17.79	9.50	10.00	95.01
A Add 4 1 005.lcd	39451	20.59	12.30	15.00	82.01
A Add 5 1 006.lcd	47195	24.56	16.27	20.00	81.35
A Add 6 1 007.lcd	54856	28.49	20.19	25.00	80.78

Де Add1 – це зразок без добавки

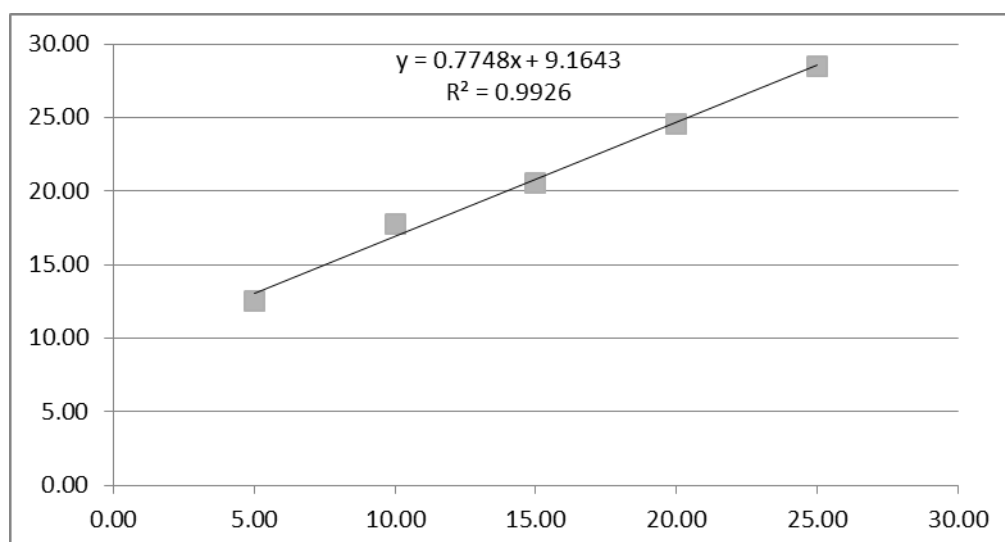


Рис. 4.3. Метод стандартних добавок NDMA для зразку А

Для оцінки похибки використовується формула:

$$\delta = |Z - 100|$$

де:

- δ - абсолютне відхилення значення Z від 100%

$$\delta = 84,7 - 100 = 15,3\%$$

Таким чином при розрахунку вмісту NDMA в зразку А відносно стандартного зразка без додавання матриці відхилення від теоретичного значення становить 15,3%, що може бути прийнятним при визначенні низьких концентрацій. Зазвичай критерій прийнятності відхилення не більше 20%. Проте, якщо стоїть задача встановити вміст точніше, то одним із підходів є розрахунок вмісту з отриманих даних методу стандартних добавок. Для цього до уваги беруть значення вільного члену а, отримане для методу стандартних добавок – 9,1643 нг/50 мг зразка і тоді пропорційний розрахунок дає вміст NDMA в зразку А на рівні 183,3 мг/1 г зразка. Тоді як метод визначення відносно зовнішнього стандарту дає результат $8,29 \cdot 1000 / 50 = 165,8$ мг/1 г зразка.

Метод стандартних добавок для визначення NDEA в зразку А

	Area	ng/50 mg Знайдено	minus Add1	ng/50 mg Введено	recovery, %
A Add 1 1 002.lcd	17340	7.02			
A Add 2 1 003.lcd	30480	11.96	4.94	5.00	98.72
A Add 3 1 004.lcd	48457	18.71	11.69	10.00	116.89
A Add 4 1 005.lcd	60807	23.35	16.33	15.00	108.85
A Add 5 1 006.lcd	73631	28.17	21.14	20.00	105.72
A Add 6 1 007.lcd	89147	34.00	26.97	25.00	107.89

De Add1 – це зразок без добавки

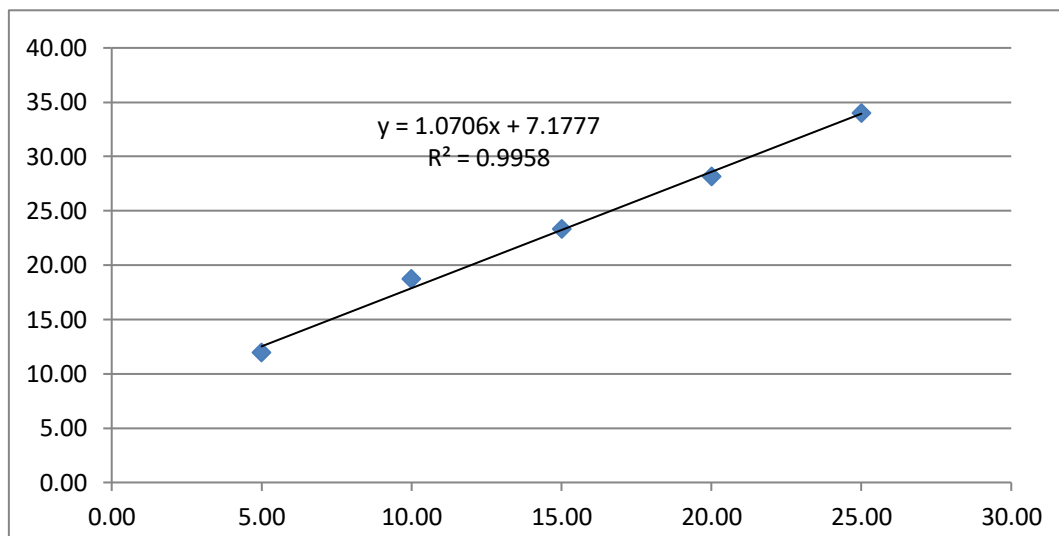


Рис. 4.4. Метод стандартних добавок NDEA для зразку А

Для оцінки похибки використовується формула:

$$\delta = |Z - 100|$$

де:

- δ - абсолютне відхилення значення Z від 100%

$$\delta = 107,6 - 100 = 7,6\%$$

Таким чином при розрахунку вмісту NDEA в зразку А відносно стандартного зразка без додавання матриці відхилення від теоретичного значення становить 7,6%, що може бути прийнятним при визначенні низьких концентрацій. Зазвичай критерій прийнятності відхилення не більше 20%. Проте, якщо стоїть задача встановити вміст точніше, то одним із підходів є розрахунок вмісту з отриманих даних методу стандартних добавок. Для цього до уваги беруть значення вільного члену а, отримане для методу стандартних добавок – 7,1777 нг/50 мг зразка і тоді пропорційний розрахунок дає вміст NDMA в зразку А на рівні 143,6 нг/1 г зразка. Тоді як метод визначення відносно зовнішнього стандарту дає результат $7,07 \cdot 1000 / 50 = 141,4$ нг/1 г зразка.

Висновок. Отримані результати свідчать про те, що розроблена аналітична методика відповідає вимогам щодо правильності, оскільки значення δ знаходиться в межах встановлених критеріїв прийнятності.

4.3. Збіжність Sample A

З отриманих даних в розділі дослідження правильності можна провести розрахунок збіжності. Збіжність відображає близькість результатів окремих кількісних визначень, отриманих за короткий проміжок часу в однакових умовах.

Розрахунок збіжності

Для оцінки збіжності використовувались дані, які були отримані при дослідженні правильності, а саме, значення "знайдено", виражене у відсотках.

$$\text{RSD, \%} = \frac{\text{SDрезультатів}}{\text{сер.значення}} * 100\%$$

де: RSD, % - відносне стандартне відхилення, яке характеризує розсіювання результатів вимірювань;

Критерієм прийнятності для збіжності є вимога, щоб невизначеність аналізу у вибраному діапазоні концентрацій не перевищувала встановлений критерій 10%.

Параметр	Критерій прийнятності	Результат	Висновок
RSD, % NDMA	$\leq 10\%$	5,9	Відповідає
RSD, % NDEA	$\leq 10\%$	6,5	Відповідає

Табл. 4.5. Результати розрахунку збіжності для зразку А

Це означає, що методика забезпечує достатню збіжність результатів вимірювань, виконаних в однакових умовах, що є важливим для забезпечення достовірності та відтворюваності аналізу.

4.4. Правильність Sample B

Для визначення правильності методики використовували методи стандартних добавок, коли до реального зразка додають відому кількість речовини, а після визначають кількість цієї речовини.

Для розрахунку правильності використовується наступна формула:

$$Z = (\text{Знайдено} / \text{Введено}) * 100\%$$

де:

- Z - відношення знайденої кількості речовини до введеної кількості, виражене у відсотках;
- Знайдено - кількість речовини, встановлена за допомогою методики;
- Введено - відома кількість речовини, додана до зразка.

Метод стандартних добавок для визначення NDMA в зразку B

	Area	ng/50 mg Знайден о	minus Add1	ng/50 mg Введено	recovery, %
A Add 1 1 002.lcd	16228	7.58			
A Add 2 1 003.lcd	4773	12.38	4.80	5.00	95.97
A Add 3 1 004.lcd	34001	17.56	9.98	10.00	99.80
A Add 4 1 005.lcd	40635	21.29	13.71	15.00	91.37
A Add 5 1 006.lcd	49198	26.09	18.51	20.00	92.57
A Add 6 1 007.lcd	58000	31.04	23.46	25.00	93.83

Де Add1 – це зразок без добавки

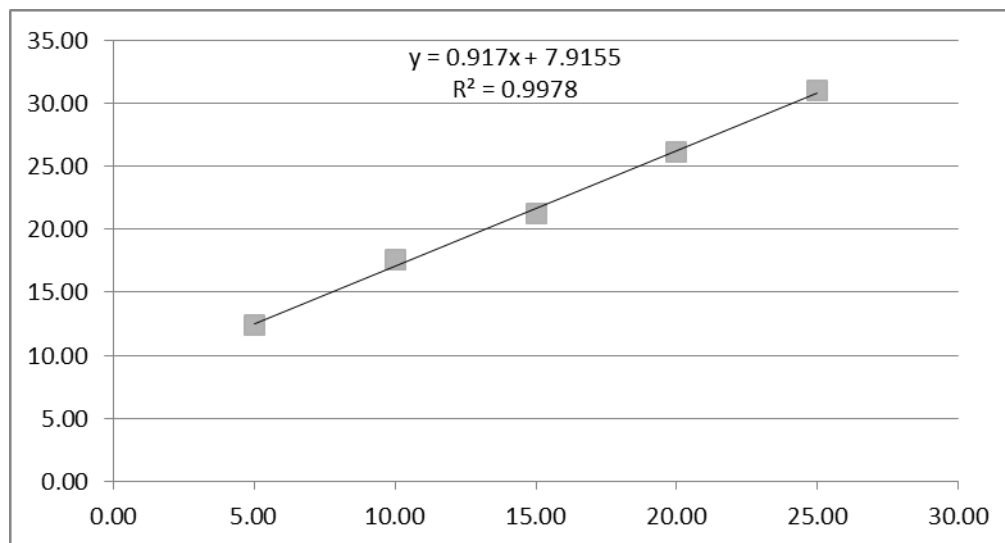


Рис. 4.5. Метод стандартних добавок NDMA для зразку В

Для оцінки похибки використовується формула:

$$\delta = |Z - 100|$$

де:

- δ - абсолютне відхилення значення Z від 100%

$$\delta = 94,7 - 100 = 5,3\%$$

Таким чином при розрахунку вмісту NDMA в зразку В відносно стандартного зразка без додавання матриці відхилення від теоретичного значення становить 5,3%, що може бути прийнятним при визначенні низьких концентрацій. Зазвичай критерій прийнятності відхилення не більше 20%. Проте, якщо стоїть задача встановити вміст точніше, то одним із підходів є розрахунок вмісту з отриманих даних методу стандартних добавок. Для цього до уваги беруть значення вільного члену а, отримане для методу стандартних добавок – 7,9155 нг/50 мг зразка і тоді пропорційний розрахунок дає вміст NDMA в зразку В на рівні 158,3 нг/1 г зразка. Тоді як метод визначення

відносно зовнішнього стандарту дає результат $8,29 \cdot 1000 / 50 = 151,6$ нг/1 г зразка.

Метод стандартних добавок для визначення NDEA в зразку В

	Area	ng/50 mg Знайдено	minus Add1	ng/50 mg Введено	recovery, %
A Add 1 1 002.lcd	6842	0.16			
A Add 2 1 003.lcd	21153	6.12	5.96	5.00	119.18
A Add 3 1 004.lcd	34267	11.58	11.42	10.00	114.20
A Add 4 1 005.lcd	45937	16.44	16.28	15.00	108.53
A Add 5 1 006.lcd	57424	21.23	21.06	20.00	105.31
A Add 6 1 007.lcd	70975	26.87	26.71	25.00	106.82

Де Add1 – це зразок без добавки

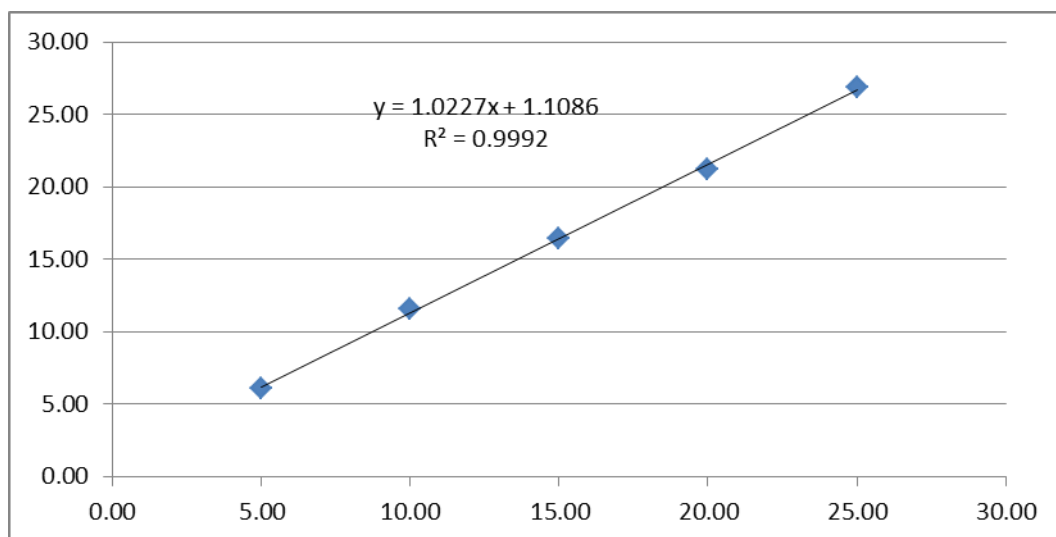


Рис. 4.6. Метод стандартних добавок NDEA для зразку В

Для оцінки похибки використовується формула:

$$\delta = |Z - 100|$$

де:

- δ - абсолютне відхилення значення Z від 100%

$$\delta = 110,8 - 100 = 10,8\%$$

Таким чином при розрахунку вмісту NDEA в зразку В відносно стандартного зразка без додавання матриці відхилення від теоретичного значення становить 10,8%, що може бути прийнятним при визначенні низьких концентрацій. Зазвичай критерій прийнятності відхилення не більше 20%. Проте, якщо стоїть задача встановити вміст точніше, то одним із підходів є розрахунок вмісту з отриманих даних методу стандартних добавок. Для цього до уваги беруть значення вільного члену a , отримане для методу стандартних добавок – 1,1086 нг/50 мг зразка і тоді пропорційний розрахунок дає вміст NDMA в зразку В на рівні 22,2 нг/1 г зразка. Тоді як метод визначення відносно зовнішнього стандарту дає результат $0,16 \cdot 1000 / 50 = 3,2$ нг/1 г зразка.

Висновок. Отримані результати свідчать про те, що розроблена аналітична методика відповідає вимогам щодо правильності, оскільки значення δ знаходиться в межах встановлених критеріїв прийнятності.

4.5. Збіжність Sample B

З отриманих даних в розділі дослідження правильності можна провести розрахунок збіжності. Збіжність відображає близькість результатів окремих кількісних визначень, отриманих за короткий проміжок часу в однакових умовах.

Розрахунок збіжності

Для оцінки збіжності використовувались дані, які були отримані при дослідженні правильності, а саме, значення "знайдено", виражене у відсотках.

$$\text{RSD, \%} = \text{SDрезультатів/сер.значення} \cdot 100\%$$

де: RSD, % - відносне стандартне відхилення, яке характеризує розсіювання результатів вимірювань;

Критерієм прийнятності для збіжності є вимога, щоб невизначеність аналізу у вибраному діапазоні концентрацій не перевищувала встановлений критерій 10%.

Параметр	Критерій прийнятності	Результат	Висновок
RSD, % NDMA	$\leq 10\%$	3,5	Відповідає
RSD, % NDEA	$\leq 10\%$	5,2	Відповідає

Табл 4.6. Результати розрахунків збіжності для зразку В

Це означає, що методика забезпечує достатню збіжність результатів вимірювань, виконаних в однакових умовах, що є важливим для забезпечення достовірності та відтворюваності аналізу.

ВИСНОВКИ

1. У межах теоретичної частини магістерської роботи проведено комплексний аналіз літературних джерел щодо токсичності та механізмів утворення полярних нітрозамінів, зокрема NDMA та NDEA, у косметичних засобах. Встановлено, що ці сполуки є високомутагенними та канцерогенними агентами, здатними утворюватися в лаках для нігтів внаслідок реакцій вторинних амінів із нітритами за участю таких компонентів як нітроцелюлоза. Особливу увагу приділено огляду сучасних аналітичних методів визначення нітрозамінів, серед яких провідне місце займають високоефективна рідинна хроматографія та мас-спектрометрія.

2. У практичній частині виконано повний комплекс завдань, визначених метою роботи. Проаналізовано актуальні дані щодо токсичності нітрозамінів, шляхів їх утворення у лаках для нігтів, а також існуючих аналітичних методик їх визначення. Вперше в межах даного дослідження

експериментально перевірено можливість заміни традиційного метанолу на етанол у системах мас-спектрометричного детектування, що дозволило підвищити екологічну безпечність методики без погіршення аналітичних характеристик. Розроблено та оптимізовано методику хроматографічного визначення полярних нітрозамінів, включаючи процедури пробопідготовки зразків лаків для нігтів. Проведено валідацію розробленої методики за основними аналітичними параметрами: правильністю, збіжністю, лінійністю, що підтвердило її відповідність вимогам міжнародних стандартів аналітичної практики. Здійснено апробацію розробленої методики на комерційних зразках лаків для нігтів різного призначення, що реалізуються на території України. Виявлено сліди полярних нітрозамінів у деяких зразках у межах допустимих норм, що свідчить про актуальність впровадження контролю даного класу домішок у косметичній продукції.

3. Виконане дослідження має суттєве наукове та практичне значення. Запропонована методика визначення полярних нітрозамінів із використанням етанолу як розчинника є екологічно безпечною альтернативою існуючим протоколам. Результати роботи можуть бути використані для вдосконалення національної нормативної бази контролю косметичних засобів та підвищення рівня захисту здоров'я споживачів. Власні висновки та рекомендації акцентують на необхідності впровадження системного контролю наявності нітрозамінів у косметичних продуктах та оптимізації виробничих технологій з метою мінімізації їх утворення.

SUMMARY

Lytvynenko Viktoriia

"DETERMINATION OF POLAR NITROSAMINES IN NAIL POLISHES MEDICAL AND COSMETIC PURPOSES"

Department of Medicinal Chemistry and Pharmaceutical Toxicology

Scientific supervisors: PhD in Chemistry, Sirotchuk O.A., PhD in Chemistry, Associate Professor Hlushachenko O.O.

Keywords. NDMA, NDEA, HPLC-MS/MS

Introduction. Given the increasing safety requirements for consumer products, especially cosmetics, the issue of carcinogenic impurities such as nitrosamines is becoming particularly relevant. Polar nitrosamines, namely NDMA and NDEA, exhibit high toxicity, mutagenic, and carcinogenic potential, and can be formed in nail polishes during manufacturing, storage, or use. The absence of clearly regulated analytical methods for their determination in cosmetic products poses risks to consumer health and complicates quality control. In this context, it is necessary to develop a sensitive, selective, and environmentally friendly analytical method capable of effectively detecting nitrosamine content in complex nail polish matrices.

Materials and Methods. The analyzed substances were N-nitrosodimethylamine (NDMA) and N-nitrosodiethylamine (NDEA)—polar nitrosamines of high toxicological concern. Samples of nail polishes for various purposes available on the Ukrainian market were used. Analytical determination was performed by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a Shimadzu LC-30 chromatograph with a triple quadrupole mass detector LCMS-8040.

Results. It was proven that the commonly used toxic organic solvent—methanol—can be replaced with environmentally safe ethanol in chromatographic analysis. This not only reduced ecological impact but also improved the safety of the method. The ethanol content in the mobile phase was optimized, with 20% selected as the best composition. Another important parameter established was the addition of 0.1% formic acid to the mobile phase, which improved the signal-to-noise ratio 7-fold for NDMA and 10-fold for NDEA. The optimal flow rate was chosen to ensure effective performance without damaging the instrument. The injection volume was selected to balance sensitivity and prevent column overload or peak distortion.

The developed sample preparation and chromatographic separation method enabled effective extraction and analysis of nitrosamines in the complex nail polish matrix. The method ensures high selectivity and analytical accuracy.

Method validation was carried out according to current standards. The obtained parameters—linearity, accuracy, and precision—confirmed the reliability of the proposed approach. Accuracy was evaluated using one of the most effective techniques: the method of standard additions, which was also used for quantification.

The method was tested on various nail polish samples available on the Ukrainian market, confirming its versatility and practical applicability. The results revealed the presence of carcinogenic nitrosamines in some products, which is a potential health hazard.

Conclusions. An effective and environmentally safe method for determining NDMA and NDEA in nail polishes using LC-MS/MS has been developed. Replacing methanol with ethanol, optimizing the mobile phase composition, and fine-tuning chromatographic conditions provided high sensitivity and analytical accuracy. The detection of nitrosamines in several samples underscores the need for stringent quality control. The method is suitable for use in cosmetic and pharmaceutical quality assurance.

Список використаної літератури

1. Наказ МОЗ України від 17.07.2024 № 1247 "Про затвердження методичних рекомендацій із застосування Технічного регламенту на косметичну продукцію, затвердженого постановою Кабінету Міністрів України від 20 січня 2021 року № 65".

2. Sanner, T., Dybing, E., Willems, M. I., & Kroese, E. D. (2001). *Pharmacol. Toxicol.*, 88, 131–139.

3. U.S. Food and Drug Administration (US FDA). (2009). *Inspection Guides: Cosmetic Product Manufactures*. Retrieved from: <http://wcms.fda.gov/FDAgov/ICECI/Inspections/InspectionGuides/default.htm>

4. Witt, O. N. (1878). On Aromatic Nitrosamines. *Journal of the Chemical Society*, 33, 202–211.

5. Vrzal, T., Olsovská, J. (2016). N-Nitrosamines in 21st Century. *Kvasny Prumysl*, 62(1), 2-8.
6. Iram, M. (2019). From Valsartan to Ranitidine: The Story of Nitrosamines So Far. *Indian Journal of Pharmacy Practice*, 13(1), 01-02.
7. Regoli, D., & Plante, G. E. (2012). Impact of Kinins in the Treatment of Cardiovascular Diseases. *Pharmacology & Therapeutics*, 135, 94.
8. Aldawsari, F. S., Alshehri, Y. M., & Alghamdi, T. S. (2021). N-Nitrosodimethylamine (NDMA) Contamination of Ranitidine Products: A Review of Recent Findings. *Journal of Food and Drug Analysis*, 29(1), 39-45.
9. View of Metformin and nitrosamine impurities. (2024). Доступно за посиланням: <https://www.msjonline.org/index.php/ijrms/article/view/8677/6046> (дата звернення: 18.01.2024).
10. Report on Carcinogens, Fifteenth Edition N-Nitrosamines: 15 Listings. (2024). Доступно за посиланням: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK590783/>.
11. Williams, D. L. H. (2004). Reagents effecting nitrosation. In: *Nitrosation Reactions and the Chemistry of Nitric Oxide*. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Science, 1–34.
12. Ogata, Y., Sawaki, Y., & Kuriyama, Y. (1968). The reaction of trialkylamine with nitric acid in a mixture of acetic acid and acetic anhydride. *Tetrahedron*, 24(8), 3425–3435.
13. Gushgari, A. J., & Halden, R. U. (2018). Critical review of major sources of human exposure to N-nitrosamines. *Chemosphere*, 210, 1124–1136. [CrossRef]
14. Park, J. E., Seo, J. E., Lee, J. Y., & Kwon, H. (2015). Distribution of seven N-nitrosamines in food. *Toxicological Research*, 31, 279–288. [CrossRef]

15. Mitch, W. A., Sharp, J. O., Trussell, R. R., Valentine, R. L., Alvarez-Cohen, L., & Sedlak, D. L. (2003). N-nitrosodimethylamine (NDMA) as a drinking water contaminant: A review. *Environmental Engineering Science*, 20, 389–404. [CrossRef]
16. Beard, J. C., & Swager, T. M. (2021). An organic chemist's guide to N-nitrosamines: Their structure, reactivity, and role as contaminants. *Journal of Organic Chemistry*, 86, 2037–2057. [CrossRef] [PubMed]
17. Bharate, S. S. (2021). Critical analysis of drug product recalls due to nitrosamine impurities. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64, 2923–2936. [CrossRef] [PubMed]
18. U.S. Food and Drug Administration. (2021). Drug Recalls. Доступно за посиланням: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/drug-recalls> (дата звернення: 21.09.2021).
19. U.S. Food and Drug Administration. (2021). *Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs: Guidance for Industry*. Center for Drug Evaluation and Research: Silver Spring, MD, USA.
20. Lim, D. S., Roh, T. H., Kim, M. K., Kwon, Y. C., Choi, S. M., Kwack, S. J., Kim, K. B., Yoon, S., Kim, H. S., & Lee, B. M. (2018). Risk assessment of N-nitrosodiethylamine (NDEA) and N-nitrosodiethanolamine (NDELA) in cosmetics. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*, 81, 465–480. [CrossRef] [PubMed]
21. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C. H., Guengerich, F. P., & Shimada, T. (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 13, 1789–1794. [CrossRef]

22. Mochizuki, M., Osabe, M., Anjo, T., Suzuki, E., & Okada, M. (1984). Mutagenicity of α -hydroxy N-nitrosamines in V79 Chinese hamster cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 108, 290–295. [CrossRef]
23. Chowdhury, G., Calcutt, M. W., & Guengerich, F. P. (2010). Oxidation of nitrosoalkylamines by human cytochrome P450 2A6: Sequential oxidation to aldehydes and carboxylic acids and analysis of reaction steps. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 8031–8044. [CrossRef]
24. Chowdhury, G., Calcutt, M. W., Nagy, L. D., & Guengerich, F. P. (2012). Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry*, 51, 9995–10007. [CrossRef] [PubMed]
25. Godoy, H. M., Diaz Gomez, M. I., & Castro, J. A. (1978). Mechanism of dimethylnitrosamine metabolism and activation in rats. *Journal of the National Cancer Institute*, 61, 1285–1289. [CrossRef] [PubMed]
26. Lake, B. G., Minski, M. J., Phillips, J. C., Gangolli, S. D., & Lloyd, A. G. (1975). Investigations into the hepatic metabolism of dimethylnitrosamine in the rat. *Life Sciences*, 17, 1599–1606. [CrossRef]
27. Kroeger-Koepke, M. B., Koepke, S. R., McClusky, G. A., Magee, P. N., & Michejda, C. J. (1981). α -Hydroxylation pathway in the in vitro metabolism of carcinogenic nitrosamines: N-nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 6489–6493. [CrossRef]
28. Cottrell, R. C., Lake, B. G., Phillips, J. C., & Gangolli, S. D. (1977). The hepatic metabolism of ^{15}N labelled dimethylnitrosamine in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 26, 809–813. [CrossRef]
29. Koepke, S. R., Tondeur, Y., Farrelly, J. G., Stewart, M. L., Michejda, C. J., & Kroeger-Koepke, M. B. (1984). Metabolism of ^{15}N -labelled N-

nitrosodimethylamine and N-nitroso-N-methylaniline by isolated rat hepatocytes. *Biochemical Pharmacology*, 33, 1509–1513. [CrossRef]

30. Swann, P. F., Mace, R., Angeles, R. M., & Keefer, L. K. (1983). Deuterium isotope effect on metabolism of N-nitrosodimethylamine in vivo in rat. *Carcinogenesis*, 4, 821–825. [CrossRef]

31. Umbenhauer, D. R., & Pegg, A. E. (1981). Alkylation of intracellular and extracellular DNA by dimethylnitrosamine following activation by isolated rat hepatocytes. *Cancer Research*, 41(1), 3471–3474.

32. Yoo, J. S., Ishizaki, H., & Yang, C. S. (1990). Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 11, 2239–2243. [CrossRef]

33. Lorr, N. A., Tu, Y. Y., & Yang, C. S. (1982). The nature of nitrosamine denitrosation by rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 3, 1039–1043. [CrossRef]

34. Lee, V. M., Keefer, L. K., & Archer, M. C. (1996). An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and alpha-hydroxylation in the hepatotoxicity of N-Nitrosodimethylamine. *Chemical Research in Toxicology*, 9, 1319–1324. [CrossRef] [PubMed]

35. Yamazaki, H., Inui, Y., Yun, C. H., Guengerich, F. P., & Shimada, T. (1992). Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis*, 13, 1789–1794. [CrossRef]

36. Yang, C. S., Yoo, J. S., Ishizaki, H., & Hong, J. Y. (1990). Cytochrome P450IIE1: Roles in nitrosamine metabolism and mechanisms of regulation. *Drug Metabolism Reviews*, 22, 147–159. [CrossRef] [PubMed]

37. Camus, A. M., Geneste, O., Honkakoski, P., Béréziat, J. C., Henderson, C. J., Wolf, C. R., Bartsch, H., & Lang, M. A. (1993). High variability of nitrosamine metabolism among individuals: Role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Molecular Carcinogenesis*, 7, 268–275. [CrossRef]

38. Verna, L., Whysner, J., & Williams, G. M. (1996). N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: Bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacology & Therapeutics*, 71, 57–81. [CrossRef]

39. von Hofe, E., Kleihues, P., & Keefer, L. K. (1986). Extent of DNA 2-hydroxyethylation by N-nitrosomethylethylamine and N-nitrosodiethylamine in vivo. *Carcinogenesis*, 7, 1335–1337. [CrossRef]

40. Yoo, J. S., Ishizaki, H., & Yang, C. S. (1990). Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 11, 2239–2243. [CrossRef]

41. IARC (1978). *Some N-nitroso Compounds: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

42. Knekt, P., Järvinen, R., Dich, J., & Hakulinen, T. (1999). Risk of colorectal and other gastrointestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *International Journal of Cancer*, 80, 852–856.

43. Archer, M. C. (1989). Mechanisms of action of N-nitroso compounds. *Cancer Survey*, 2, 241–250.

44. EPA Integrated Risk Information System (IRIS). (1993). *BN-nitrosodimethylamine; CASRN 62–75-9*. Доступно за посиланням: https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0045_summary.pdf (дата звернення: 21.01.2019).

45. The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH). (2017). *ICH M7 assessment and control of DNA Reactive (Mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk - Step 4*. Доступно за посиланням: https://database.ich.org/sites/default/files/M7_R1_Guideline.pdf (дата звернення: 01.12.2020).

46. U.S. Food & Drug Administration. (2020). Final response letter from FDA CDER to Valisure, LLC. Доступно за посиланням: <https://www.regulations.gov/document?D=FDA2019-P-4281-0008> (дата звернення: 12.05.2020).

47. Food and Drug Administration. (2021). *Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs-Guidance for Industry*. Доступно за посиланням: <https://www.fda.gov/media/141720/download> (USP 01.12.2021).

48. A Rapid, Validated RP-HPLC Method for the Determination of Seven Volatile N-Nitrosamines in Meat. (2014).

49. Development and Validation of Four Nitrosamine Impurities Determination Method in Medicines of Valsartan, Losartan, and Irbesartan with HPLC-MS/MS (APCI). (2021).

50. Chidella, K. S., Dasari, V. B., & Anireddy, J. (2021). Ultra-Sensitive LC-MS/MS Method for the Trace Level Quantification of Six Potential Genotoxic Nitrosamine Impurities in Telmisartan. *June 2021*.

ДОДАТКИ

Додаток 1

	75,10→58,10	75,10→43,10
Сигнал	97500	17000
Шум	1500	40
S/N	130	850

Таблиця визначених величин при виборі органічного розчинника для NDMA при русі фази H₂O-MeOH (80:20)

Додаток 2

	75,10→43,10	75,10→58,10
Сигнал	47000	9700
Шум	60	50
S/N	1567	388

Таблиця визначених величин при виборі органічного розчинника для NDMA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

Додаток 3

	103,10→75,00	103,10→29,00	103,10→47,00
Сигнал	37000	49000	16500
Шум	300	150	150
S/N	247	653	220

Таблиця визначених величин при виборі органічного розчинника для NDEA при русі фази H₂O-MeOH (80:20)

Додаток 4

	103,10→75,00	103,10→29,20	103,10→47,00
Сигнал	26500	54500	15500
Шум	180	80	50
S/N	294	1363	620

Таблиця визначених величин при виборі органічного розчинника для NDEA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

Додаток 5

	75→43	75→58
Сигнал	54000	14500
Шум	40	40
S/N	2700	725

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (90:10)

Додаток 6

	75→43	75→58
Сигнал	43000	11000

Шум	40	60
S/N	2150	367

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (80:20)

Додаток 7

	75→43	75→58
Сигнал	30750	5700
Шум	55	50
S/N	1118	228

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (70:30)

Додаток 8

	75→43	75→58
Сигнал	26000	6250
Шум	45	40
S/N	1156	313

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-EtOH (60:40)

Додаток 9

вода-етанол(96%)	75→43	75→58
80-20	2150	367
70-30	1118	228
60-40	1156	313

Підсумкова таблиця значень співвідношення сигнал/шум при різних співвідношеннях води і етанолу(96%)

Додаток 10

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	27000	25000	8000
Шум	250	200	70
S/N	216	250	229

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDEA при русі фази H₂O-MeOH (90:10)

Додаток 11

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	21250	22500	9000
Шум	250	50	100
S/N	170	900	180

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази H₂O-MeOH (80:20)

Додаток 12

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	22500	30000	10000
Шум	220	250	100
S/N	206	240	200

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази Н₂О-МеОН (70:30)

Додаток 13

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	17500	17500	7500
Шум	300	100	200
S/N	117	146	75

Таблиця визначених величин при виборі % вмісту етанолу в рухомій фазі для визначення NDMA при русі фази Н₂О-МеОН (60:40)

Додаток 14

вода-етанол(96%)	103→75	103→29	103→47
90-10	216	250	229
80-20	170	900	180
70-30	206	240	200
60-40	117	146	75

Підсумкова таблиця значень співвідношення сигнал/шум при різних співвідношеннях води і етанолу(96%) для NDEA

Додаток 15

	75→43	75→58
Сигнал	46000	10500
Шум	45	17
S/N	2044	1235

Таблиця визначених величин при виборі компонента рухомої фази H₂O-
EtOH (80:20) для визначення NDMA

Додаток 16

	75→43	75→58
Сигнал	42000	7500
Шум	70	50
S/N	1200	300

Таблиця визначених величин при виборі компонента рухомої фази 0.1%
мурашина кислота у воді – етанол (96%) = 80-20
для визначення NDMA

Додаток 17

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	27500	35000	12000
Шум	500	250	225
S/N	110	280	107

Таблиця визначених величин при виборі компонента рухомої фази H₂O-
EtOH (80:20) для визначення NDEA

Додаток 18

	103→75	103→29	103→47
Сигнал	27500	37500	10000
Шум	325	150	250
S/N	169	500	80

Таблиця визначених величин при виборі компонента рухомої фази 0.1%
мурашина кислота у воді – етанол (96%) = 80-20
для визначення NDEA

	1,0 мл/хв	0,5 мл/хв
Signal	4075	9800
Noise	100	80
S/N	81.5	245

Таблиця визначених величин при виборі швидкості рухомої фази

NDMA 75.1-43.1				
	Швидкість потоку			
	0,2 мл/хв	0,3 мл/хв	0,4 мл/хв	0,5 мл/хв
Signal	14500	18100	21400	17700
Noise	100	90	100	95
S/N	290	402,2	428	372,6
NDEA 103.1-29.1				
	Швидкість потоку			
	0,2 мл/хв	0,3 мл/хв	0,4 мл/хв	0,5 мл/хв
Signal	10750	13200	20900	24500
Noise	200	250	250	300
S/N	107,5	105,6	167,2	163,3

Таблиця визначених величин при виборі оптимальної швидкості потоку
для визначення NDMA та NDEA

NDMA 75.1-43.1					
Об'єм інжекції					
	1	5	10	20	50
Signal	2000	11000	22500	43000	117000
Noise	70	100	100	100	80
S/N	57,1	220	450	860	2925
NDEA 103.1-29.1					
Об'єм інжекції					
	1	5	10	20	50
Signal	1700	8750	17300	34500	80500
Noise	220	200	250	200	200
S/N	15,5	87,5	138,4	345	805

Таблиця визначених величин при виборі об'єму інжекції для визначення

NDMA та NDEA

NDMA 75.1-43.1			
Рухома фаза			
	вода	0,1%Н ₂ СООН Умови води	0,1%Н ₂ СООН
Signal	21400	20500	13250
Noise	100	80	80
S/N	428	512,5	331,25
NDEA 103.1-29.1			
Рухома фаза			

	вода	0,1%НСООН Умови води	0,1%НСООН
Signal	20900	20250	17750
Noise	250	150	150
S/N	167,2	105,6	236,7

Таблиця визначених величин при удосконаленні умов рухомої фази для визначення NDMA та NDEA