مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (36) العدد (1) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (36) No. (1) 2014

مساهمة تحليلية لمقايسة بعض مركبات ن-نتروزأمين الطيارة في اللحوم باستخدام طريقة الكروماتوغرافيا الغازية ومتحري التأين اللهبي

الدكتور زيد العساف*
الدكتور فرانسواه قره بيت**
محمد القسيم***

(تاريخ الإيداع 4 / 12 / 2013. قُبِل للنشر في 21 / 1 /2014)

□ ملخّص □

تم تحديد شروط الفصل المثلى من أجل التحليل الكمي لمركبات ن-نتروزأمين الطيارة Volatile N-nitrosamines من عينات اللحوم ومنتجاتها بطريقة الكروماتوغرافيا الغازية Gas Chromatography (GC) المجهزة بمتحرٍّ (مكشاف) التأين اللهبي Flame ionization Detector (FID) باستخدام عمود Optima XLB (30m × 0.25 mm × 0.25µm). أظهرت النتائج أن الطريقة ذات حد كشف منخفض (LOD) وأنها ذات خطية Linearity وتكرارية repeatability مع معدل للاستردادية Recovery تراوح بين 89% و 105.5% وقيم مقبولة للانحراف المعياري النسبي RSD.

الكلمات المفتاحية: لحوم، نتروزأمين، تحليل الأغذية. الكروماتوغرافيا الغازية

*أستاذ دكتور- قسم الكيمياء التحليلة والغذائية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق - دمشق- سورية.
**أستاذ مساعد - قسم الكيمياء- كلية العلوم - جامعة دمشق- دمشق - سورية.
***طالب دراسات عليا (دكتوراه)- قسم الكيمياء التحليلة والغذائية - كلية الصيدلة- جامعة دمشق- دمشق، سورية.

مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية _ سلسلة العلوم الصحية المجلد (36) العدد (1) 2014
Tishreen University Journal for Research and Scientific Studies - Health Sciences Series Vol. (36) No. (1) 2014

An Analytical Contribution to Determine Some Volatile N- Nitrosamines in Meat, Using Gas Chromatography and Flame Ionization Detector (GC-FID)

Dr. Zaid Alassaf*
Dr. François Karabeet**
Mohammad AL-Kaseem***

(Received 4 / 12 / 2013. Accepted 21 / 1 / 2014)

□ ABSTRACT □

Conditions for Gas chromatography (GC) equipped with Flame Ionization Detector (FID) were optimized in order to dtermine volatile N-nitrosamine in meat and meat products, using optima XLB (30m × 0.25 mm × 0.25µm) column. Results reveal that the method has a low detection limit with repeatability and linearity and with average recovery ranging from 89% to 105.5% and accepted relative standard deviation.

Keywords: Meat, Nitrosamine, Food Analysis, GC.

***Professor, Department of Food and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syria.**
****Associate Professor, Department of Chemistry, Faculty of Science, Damascus University, Damascus, Syria.**
*****PhD Student, Department of Food and Analytical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Damascus University, Damascus, Syria.**

مقدمة:

تُضاف أملاح النترات Nitrate والنتريت Nitrite إلى منتجات اللحوم المُدخنة لمنع نمو المطمثيات الوشيقية Clostridium botulinum التي تفرز ذيفانات Toxins شديدة الخطورة على المستهلكين [1]. ولأهداف تقنية أخرى تتمثل في المحافظة على اللون الأحمر للحوم المعلبة وإكسابها الطعم النوعي الخاص كما في السجق والمرتديلا [2،3]. وينتج عن اضافة هذه الأملاح تفاعلات غير مرغوبة مع الأمينات Amines وبالأخص الأمينات الثانوية، تقود في النهاية إلى تشكل مركبات ن-نتروزأمين N-nitrosamines [4،5]. تتواجد مركبات ن-نتروزأمين NAs في الغذاء والماء والهواء ويمكن أن تصطنع في جسم الإنسان، ولقد حازت مركبات NAs على اهتمام كبير بسبب السمية العالية حيث أثبتت التجارب المخبرية على حيوانات التجربة أن 80% من مركبات ن-نتروزأمين تملك تأثيراً مسرطناً ومولداً للطفرات ومشوهاً للأجنة [6،7]. يعتمد تشكل مركبات NAs في منتجات اللحوم على درجة حرارة الطهي وزمنه وطريقته وعلى وجود طلائع مركبات NAs ومحفزات catalyst ومثبطات تفاعل النترزة nitrosation reaction وعلى شروط التخزين وغيرها من العوامل [4].

يتم تحضير العينات الغذائية للتحليل بإخضاعها لعمليات استخلاص وتنقية تشمل واحدة أو أكثر من الطرائق التحليلية التقليدية [8]، مثل الاستخلاص سائل-سائل liquid-liquid extraction [9]، والاستخلاص سائل -صلب Solid –liquid extraction [10]، والاستخلاص بالسائل فوق الحرج Supercritical fluid extraction [11]، والاستخلاص الدقيق بالطور الصلب solid phase micro extraction (SPME) [12]، وطرائق الكروماتوغرافيا Chromatography [13]، وتجري مقايسة هذه المركبات بطرائق الكروماتوغرافيا مثل الكروماتوغرافيا الغازية gas chromatography والكروماتوغرافيا السائلة liquid chromatography [14]، وطرائق الرحلان الكهربائي electrophoresis [15]. وتُكشف هذه المركبات باعتماد متحريات (مكشافات) detectors نوعية مثل مطياف الكتلة mass spectrometer [16]، ومتحري تحليل الطاقة الحرارية thermal energy analyzer [8].

أهمية البحث وأهدافه:

نظراً لعدم توفر متحري تحليل الطاقة الحرارية في الجمهورية العربية السورية وندرة متحري مطيافية الكتلة MS ولعدم وجود أية دراسات حتى تاريخ تسجيل هذا البحث في سورية عن وجود وتشكل مركبات نتروزأمين وفق فهرس الأبحاث العلمية لمكتبة الأسد الوطنية التي تضم جميع الأبحاث العلمية المسجلة في وزارة التعليم العالي ووزارة الصحة وغيرها من وزارت الدولة [17]، ونظراً لتوفر جهاز الكروماتوغرافيا الغازية المزود بمتحري التأين اللهبي GC-FID يهدف هذا البحث إلى المساهمة بمحاولة تطوير طريقة تحليلية بسيطة وغير مكلفة ولا تحتاج لأجهزة معقدة لفصل ومقايسة بعض مركبات ن-نتروزأمين الطيارة في اللحوم، تم إجراء هذا البحث في مخبر التحليل الآلي في كلية الصيدلة في جامعة القلمون الخاصة في الفترة بين كانون الثاني وحزيران من عام 2012.

طرائق البحث ومواده :

التجهيزات Equipments

- أنابيب اختبار Pyrex مزودة بغطاء من التفلون Teflon
- أوتوغلاف autoclave من شركة Selecta اسبانيا طراز 4001757

- مبخر تكثيف العينات Kuderna Danish (KD)
- عمود زجاجي (30 cm × 1.5 cm)
- جهاز الكروماتوغرافيا الغازية موديل 2014 Shimadzu المزود بنظام حقن Split/Splitless ومتحري التأين اللهبي Flame Ionization Detector (FID) وبرمجية التحكم GC-Solution وعمود شعري Optima-XLB من شركة (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co) بأبعاد 0.25 µm ,0.25 mm i.d. 30 m

المواد الكيميائية Chemicals

المواد المعيارية والكواشف المستخدمة في هذا البحث جميعها من الصنف التحليلي عالي النقاوة (أعلى من 99%) وتم شراؤها من شركة Sigma-Aldrich. محلول معياري EPA 521 Mix standard يحوي سبعة مركبات ن-نتروزأمين تركيز كل منها 2000 µg/mL ‏N-nitrosodiethylamine (NDMA)، N-nitrosomethylethylamine(NMEA)، N-nitrosodiethylamine (NDEA)، N-nitrosodiproylamine (NDPA)، N-nitrosopiperidine (NPIP)، N-nitrosopyrrolidine (NPYR)، N-nitrosodi butylamine (NDBA)، حفظت جميع الكواشف والمواد المعيارية في درجة حرارة ‎-20 °C‎ وبعيداً عن الضوء.

طرائق الاعتيان Sampling

تم ضبط الطريقة على عينات اللحم البقري الطازج غير المعالج حرارياً أو كيميائياً، حُفظت عينات اللحوم في درجة حرارة ‎-20 °C‎ (في المجمدة) حتى وقت التحليل.

تحضير العينة واستخلاص مركبات ن-نتروزأمين Sample Preparation and Extraction of N-nitrosamines

تم اعتماد طريقة استخلاص جديدة تمَ تطويرها من قبل فريق العمل [18]، حيث يوزن بدقة 1غ من العينة في أنبوب اختبار سعة 20 مل مزود بغطاء من التفلون، ثم يضاف 10 مل من محلول 40 غ/ل NaOH و10 ملغ من الأسكوربيك أسيد ascorbic acid (تثبيط تشكل ن-نتروزأمين أثناء الاستخلاص)، يُحضن الأنبوب بعد إغلاقه بإحكام في الأتوغلاف Autoclave بدرجة 121°C لمدة 10 دقائق، يترك للراحة في درجة حرارة الغرفة وينقل بعدها محتوى الأنبوب إلى حبابة ابانة سعة 50 مل، يغسل الأنبوب مرتين في كل مرة بـ 5 مل من الايتانول ethanol ومن ثم بـ 10 مل بدي كلوروميثان (DCM) Dichloromethane وتضاف الغسالات إلى حبابة الإبانة، ويضاف بعد ذلك 10 مل من محلول كلوريد الصوديوم المشبع و10 مل من DCM، تُحرك حبابة الإبانة بشكل دائري وتترك للراحة في وضع قائم حتى انفصال كامل للطبقة العضوية (DCM) عن الطبقة المائية، تؤُخذ الطبقة العضوية وتجفف بكبريتات الصوديوم اللامائية Na_2SO_4، ومن ثم يبخر DCM إلى 0.5 مل باستخدام مبخر خاص نوع Kuderna-Danish (KD)، تنقى الخلاصة الأخيرة التي تم الحصول عليها بعد التبخير على عمود هلامة السيليس (30 cm× 1.5 cm) المفعل مسبقاً بعد ترطيبه بـ 10 مل DCM، تشطف مركبات ن-نتروزأمين المحتجزة ضمن العمود بـ 10 مل من DCM وتكثَف الشطافة إلى 1 مل بمبخر Kuderna - Danish ثم يحقن 1 ميكرو ليتر(µl) بنمط حقن غير مجزأ splitless في GC-FID.

تحضير المحاليل المعيارية لمزيج مركبات ن-نتروزأمين N-nitrosamine Mix Standard Preparation

تم تحضير سلسلة من المحاليل المعيارية انطلاقاً من المحلول المعياري EPA 521 nitrosamine mix standards وذلك بتمديد المحلول السابق بنسبة 20/1 بمحل DCM حيث تم الحصول على محلول معياري ثانوي تركيزه 100 µg/mL من كل من المركبات التالية : NDMA، NMEA، NDEA، NDPA، NPIP، NPYR، NDBA . وبتمديد مناسب بمحل DCM للمحلول المعياري الثانوي تم تحضير التراكيز التالية في دوارق معيارية سعة 100 مل: 4 ، 10، 50، 100، 500، 1000 µg/mL (ppb). حفظت جميع المحاليل بعيداً عن الضوء في درجة حرارة 4 °C +.

طريقة التحليل Analysis Method [18]

تم تحليل مركبات ن-نتروزأمين الطيارة في خلاصة عينات اللحوم بجهاز الكروماتوغرافيا الغازية 2014 Shimadzu المزود بمتحري التأين اللهبي GC-FID وعمود OPTIMA XLB بأبعاد 30m×0.25mm×0.25µm وتدفق الغاز الحامل (helium) 1 ml/min ودرجة حرارة الحاقن 250 °C، ودرجة حرارة المتحري 290 °C، وحجم الحقنة 1µl، بنمط غير مجزأ speltless، تم ضبط البرنامج الحراري للفرن برفع درجة الحرارة للدرجة 40 °C والمحافظة عليها لمدة ثلاث دقائق، ومن ثم للدرجة 100°C بمعدل 10°C بالدقيقة وتثبيت الحرارة عند الدرجة 100°C لمدة دقيقة واحدة، ومن ثم رفع درجة الحرارة للدرجة 250°C بمعدل 15°C بالدقيقة، وتثبيت درجة حرارة الفرن عند الدرجة 250°C لمدة دقيقتين. وتم تعيين التراكيز بطريقة السلسلة المعيارية الخارجية external standard series.

تحديد أزمنة الاحتفاظ لمركبات ن-نتروزأمين Determination of N-nitrosamine Retention Times

تم تحديد أزمنة الاحتفاظ Retention time من خلال حقن المحاليل المعيارية ويبين الجدول (1) أزمنة الاحتفاظ للمركبات ن-نتروزأمين الطيارة موضوع البحث والتي تم تحليلها وفق البرنامج الحراري المعتمد.

الجدول (1) أزمنة الاحتفاظ لمركبات ن-نتروزأمين في عينات اللحوم

المركب	زمن الاحتفاظ (retention time) بالدقيقة
NDMA	5.617
NMEA	7.344
NDEA	8.733
NPYR	12.104
NDPA	12.224
NPIP	12.853
NDBA	14.681

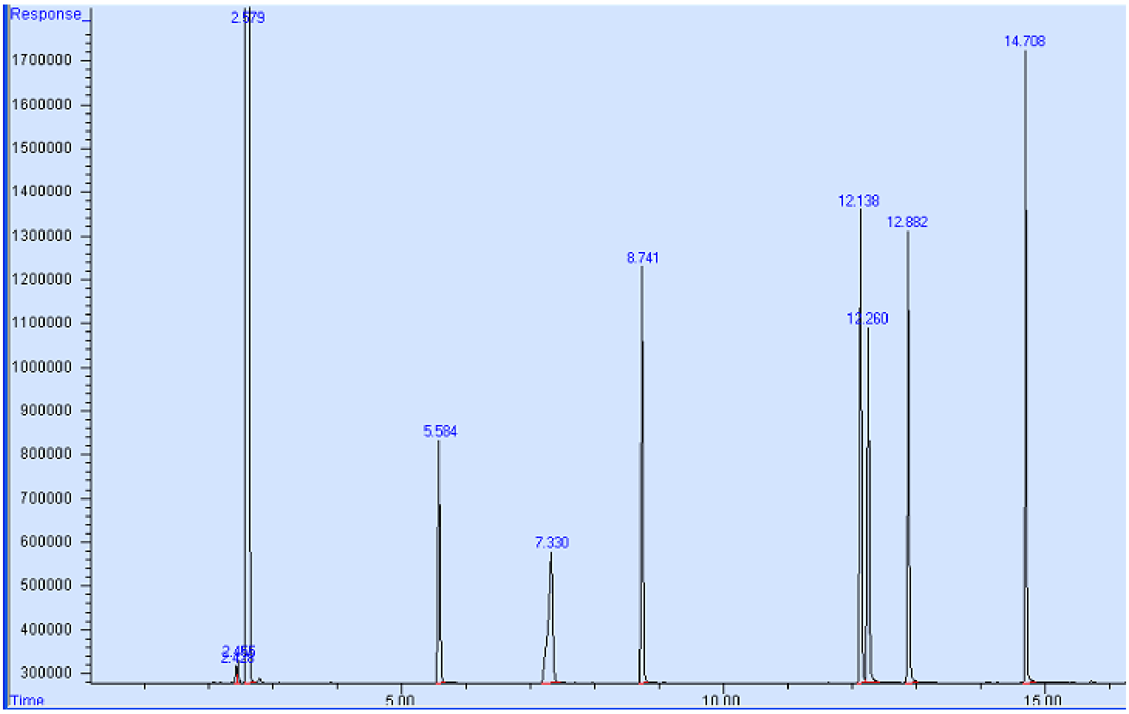
النتائج والمناقشة:

ضبط الطريقة Method Validation

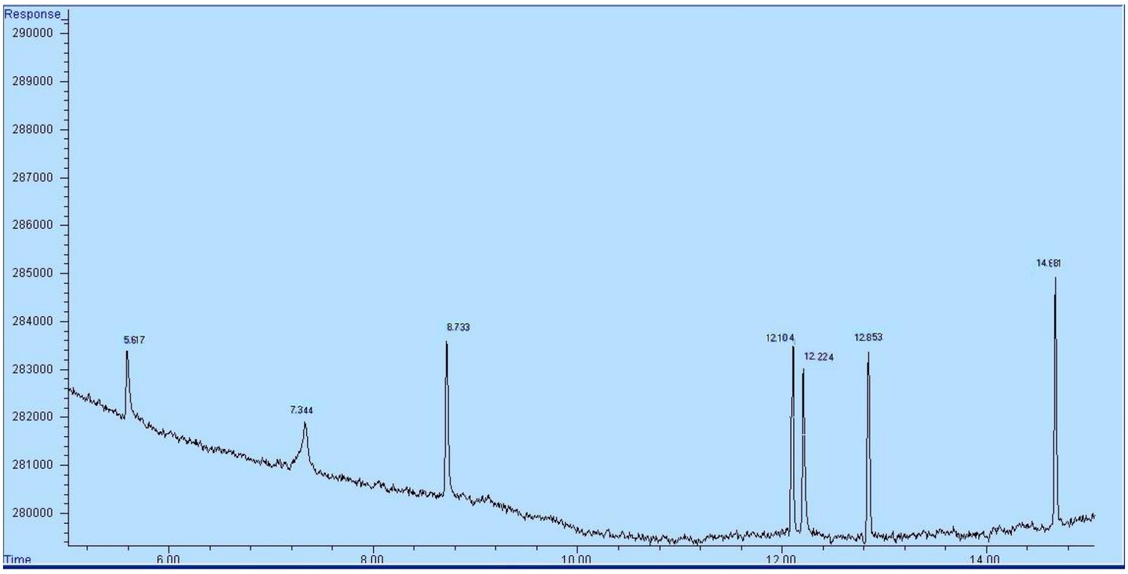
تم ضبط الطريقة التحليلية بعد ضبط الشروط الكروماتوغرافية للتأكد من أداء الطريقة التحليلية وملاءمتها للهدف التحليلي وذلك من خلال تقييم البارامترات التحليلية (المجال Range والخطية Linearity والدقة Precision والمضبوطية Accuracy والانتقائية Selectivity وحد الكشف Limit of Detection وحد القياس الكمي Limit of Quantification[19],

تحديد الخطيةLinearity

تم تحديد الخطية لمجال البحث عن مركبات ن –نتروزأمين الطيارة بتراكيز دون 100 ppb (µg/mL)، ولذلك حٌضرت سلسلة من كل مركب من مركبات ن –نتروزأمين بتراكيز 4 و10 و 50 و 100 ppb لكل مركب من مركبات ن –نتروزأمين (جميع التراكيز تم تحضيرها انطلاقاً من محلول عياري تركيزه 2000 µg/mL بالتمديد المناسب بمحل DCM). حٌسب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري ومعامل الاختلاف للطريقة التحليلية لتركيز كل مركب من المركبات المدروسة. بينت النتائج أن الطريقة تتمتع بالخطية ويلخص الجدول (2) قيم المعاملات التي تم الحصول عليها عند فحص الخطية لمركب NDMA كما يبين الشكل (1) المخطط الكروماتوغرافي chromatograms الذي تم الحصول عليه عند حقن مزيج من المواد المعيارية بتركيز 50 ppb حيث تتشابه أزمنة الاحتفاظ التي تم الحصول عليها عند تحليل مستخلص عينات اللحوم كما هو موضح في الشكل (2) ويعود الفرق الطفيف المقدر بالثواني بين أزمنة الاحتفاظ لمركبات ن –نتروزأمين عند حقنها بشكل صرف لتداخل مكونات العينة واختلاف زمن استجابه الجهاز بعد إعطاء إشارة البدء، حيث تتم هذه العملية يدوياً وذلك بحقن العينة ومن ثم ضغط مفتاح البدء start. ويبين الجدول (3) معادلات الخطية ومجال الخطية ومعاملات الارتباط لتراكيز مختلف مركبات ن–نتروزأمين، في حين يبين الشكل (3) الخط البياني الممثل لخطية الطريقة التحليلية المستخدمة عند تحليل مركب NDMA.



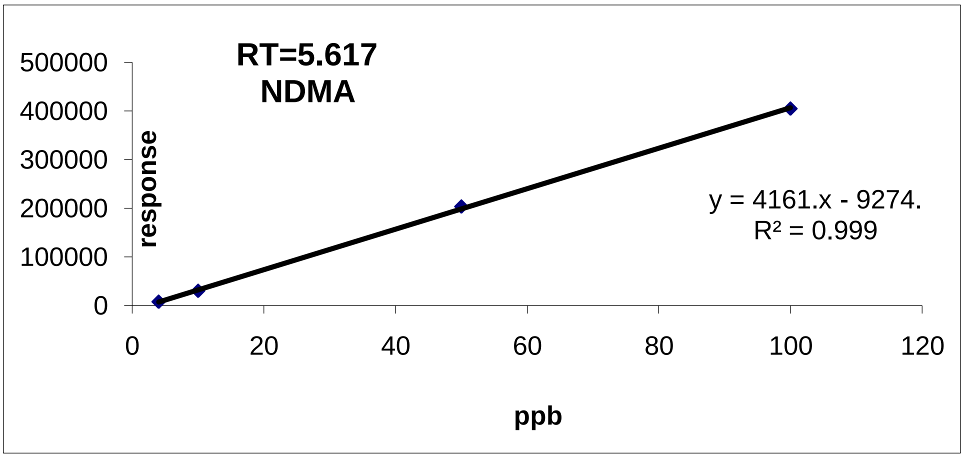
الشكل (1): المخطط الكروماتوغرافي Chromatogram لحقن مزيج من NAs تركيز كل منها 50 ppb



الشكل (2): المخطط الكروماتوغرافي Chromatogram لعينة اللحوم

الجدول (2) نتائج اختبار خطية الطريقة التحليلية عند معايرة مركب NDMA

NDMA	المحلول المعياري 1 4 ppb	المحلول المعياري 2 ppb10 ppb	المحلول المعياري 3 50 ppb	المحلول المعياري 4 100 ppb
الحقنة 1	7358	29838	203348	404883
الحقنة 2	7523	28690	204901	402200
الحقنة 3	7350	28434	201900	402444
المتوسط الحسابي	7410.333	28754	203383	403175.7
الانحراف المعياري	69.05191	251.9683	1061.23	1049.077
معامل الاختلاف	0.931833	0.876289	0.521789	0.260203



الشكل (3) الخط البياني الممثل لخطية الطريقة عند تحليل NDMA

الجدول (3) معادلات الخطية ومجال الخطية ومعاملات الارتباط للتراكيز المدروسة

المركب	معادلة الخطية	مجال الخطية (ppb)	معامل الارتباط
NDMA	*y=4161.7x-9274.8*	*0.6-500*	*0.9997*
NMEA	*y=5816.1x-14015*	*0.43-500*	*0.9994*
NDEA	*y=7095.3x-13214*	*0.33-500*	*0.9996*
NPYR	*y=8699.3x-8839.9*	*0.26-500*	*0.9995*
NDPA	*y=6674.6x-3555.2*	*0.25-500*	*0.9981*
NPIP	*y=7992.3x-141000*	*0.34-500*	*0.9995*
NDBA	*y=9805.1x-16361*	*0.309-500*	*0.9998*

اختبار الاستردادية (المضبوطية)Recovery (accuracy)

لتعيين الاستردادية تم مقايسة المستخلص من عينتين من اللحم الطازج غير المعالج بثلاثة مكررات بحقن العينة عند ثلاثة مستويات من التركيز (1 و5 و10 µg/mL) لكل مركب من مركبات ن–نتروزأمين وذلك بإضافة حجم مناسب من المحلول المعياري للعينة ومن ثم اسُتخلصت مركبات NAs من العينات وتمت مقايستها ويبين الجدول (4) أن الاستردادية للتراكيز تراوحت بين 89% 105.5%.

تحديد التكرارية (الدقة) Repeatability (precision)

لتحديد التكرارية تمت مقايسة عينة من اللحم الطازج غير المعالج (بعد إضافة 50 ppb من كل مركب من المركبات المدروسة) ست مرات وحساب المساحة تحت المنحني والانحراف المعياري النسبي وبينت النتائج أن قيمة الانحراف المعياري تراوحت بين 2.8 و4.4 وهي قيمة مقبولة عند تحليل المركبات التي توجد بآثار زهيدة في العينات الغذائية، ويبين الجدول (5) النتائج التي تم الحصول عليها حيث كان متوسط الاستردادية مقبولاً لجميع مركبات ن–نتروزأمين وفق التوصيات العالمية الخاصة بالتحليل الكمي [19] وتراوح بين 89–105.5%.

الجدول (4) نتائج اختبار المضبوطية

ن–نتروزأمين	محتوى خلاصة العينة µg/kg (بدون حقن)	الكمية المضافة µg/kg	متوسط الاستردادية%
NDMA	nd*	1	98
		5	91
		10	89.1
NMEA	nd*	1	102
		5	89.90
		10	89
NDEA	nd*	1	105.5
		5	89.2
NDPA	nd*	1	101
		5	94
		10	92
NDBA	nd*	1	89.3
		5	92.6
		10	94
NPIP	nd*	1	101
		5	90.1
		10	89.5
NPYR	nd*	1	100
		5	89
		10	89.7

nd*: غير قابل للكشف

حدود القياس الكمي (Quantitation of limit(LOQ

تم تعيين حد القياس الكمي بقياس نسبة الإشارة إلى الضجيج signal–to–noise ratio من المعلومات التي تم الحصول عليها من المخططات الكروماتوغرافية حيث إن حد القياس الكمي يساوي عشرة أضعاف نسبة الإشارة إلى الضجيج LOQ = 10 × signal–to–noise ratio ويبين الجدول (6) قيم حد الكشف الكمي التي تم الحصول عليها عند تطبيق هذه الطريقة لتعيين مركبات ن–نتروزأمين الطيارة [19].

حدود الكشف (Detection Limit)

تم تعيين حد الكشف بقياس نسبة الإشارة إلى الضجيج signal–to–noise ratio من المعلومات التي تم الحصول عليها من المخططات الكروماتوغرافية حيث إن حد الكشف يساوي إلى ثلاثة أضعاف نسبة الإشارة إلى الضجيج LOQ = 3×signal–to–noise ratio ويبين الجدول (7) قيم حد الكشف الكمي التي تم الحصول عليها عند تطبيق هذه الطريقة على مختلف مركبات ن–نتروزأمين [19].

الجدول (5) نتائج اختبار التكرارية

المركب	مساحة القمة لعينة لحوم طازجة بعد الحقن بـ 50 ppb						متوسط المساحة	RSD %
	مكرر 1	مكرر 2	مكرر 3	مكرر 4	مكرر 5	مكرر 6		
NDMA	203348	193880	201070	219878	203390	204543	204351.5	3.8
NMEA	287513	272386	272842	286008	287500	286455	282117.3	2.8
NDEA	353106	336851	342273	370075	351160	340889	349059	3.1
NDPA	442116	424485	424161	474686	442116	442189	441625.5	3.8
NPIP	355971	348136	332141	384658	355961	355911	352999	4.4
NPYR	400387	382267	388804	426099	382767	400544	396811.3	3.7
NDBA	483347	474877	484561	526402	482555	483444	489197.7	3.4

الجدول (6) حد الكشف الكمي (المعايرة) لمركبات ن–نتروزأمين في خلاصة العينة

ن–نتروزأمين	حد التحليل الكمي ppb
NDMA	0.6
NMEA	0.43
NDEA	0.33
NDPA	0.26
NDBA	0.25
NPIP	0.34
NPYR	0.309

الجدول (7) حد الكشف لمركبات ن–نتروزأمين في خلاصة العينة

ن–نتروزأمين	حد الكشف ppb
NDMA	0.18
NMEA	0.13
NDEA	0.1
NDPA	0.08
NDBA	0.077
NPIP	0.105
NPYR	0.093

الاستنتاجات والتوصيات:

بينت الدراسة أن طريقة تحليل مركبات ن–نتروزأمين الطيارة باعتماد طريقة الكروماتوغرافيا الغازية وباستخدام متحري التأين اللهبي تبدي حساسية عالية وتمكن من تحري وجود مركبات ن–نتروزأمين الطيارة وتقديرها بحدود تصل إلى 0.1 µg/kg في عينات اللحوم ومقايستها عند وجودها في هذه العينات بتراكيز أكبر من حد التحليل الكمي 0.6 µg/kg مما يسمح باستخدام هذه الطريقة للكشف الكيفي والكمي لهذه المجموعة من المركبات المسرطنة وذلك بسبب الخصائص التحليلية للطريقة المتبعة حيث أبدت تكرارية وخطية ملائمة للعمل ومناسبة للتحليل الكمي وكانت قيم الانحراف المعياري النسبي منخفضة دون 20% وبلغت الاستردادية لمختلف التراكيز المدروسة بين 89–105.5% مما يسمح باعتماد هذه الطريقة التحليلية لفصل ومقايسة مركبات ن–نتروزأمين الطيارة في اللحوم ومنتجاتها خاصة عند عدم توفر الأجهزة النوعية كمتحري تحليل الطاقة الحرارية ومطياف الكتلة.

المراجع:

1. HONIKEL, K. O.*The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meat products*. Meat Sci, 78, Germany, 2008, 68–76.
2. CASSENS, R. G. *Use of sodium nitrite in cured meats today.* Food Tech., 49, USA, 1995, 72–79, 115.
3. BYUN, M.W., AHN, H.J., KIM, J.H., LEE, J.W., YOOK, H.S., HAN, S.B. *Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer*. J. Chromatogr. A 1054, South Korea, 2004, 403–407
4. DOMANSKA, B. K., RACHUBIK, J., KOWALSKA, B. *Occurrence of volatile N-nitrosamines in Polish tinned foods*. Bull. Vet. Inst. 49, Poland, 2005, 319–322.
5. OZEL, M.Z. JACQUELINE, F. *Determination of volatile nitrosamines in various food products using comprehensive gas chromatography –nitrogen chemiluminescence detection*. J. Food Chem. Toxicol., Turkey, VOL.48, 2010, 3268-3273
6. MAN, C. H., HSIN, C. C., SSU, C. F., WANG, H. D. *Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – Chemical ionization mass spectrometry*. Food Chem.138, Taiwan, 2013, 227–233.

7. SANCHES, F., ANGEL, R. *Determination of nitrosamines in preserved sausages by solid-phase extraction–micellar electro kinetic chromatography*. J. Chromatogr. A. 985, Brazil, 2003, 503–512.
8. LEO, M. L. NOLLET; F. T. *Handbook of Processed Meats and Poultry Analysis*. CRC Press, London, 2008, 692
9. CHENG, R.C., HWANG, C.J., ANDREW-TALE, C. G. YINGBO, S. CARR, I.H. *Alternative methods for the analysis of NDMA and other nitrosamines in water,* JAWWA 98 (12) ,2006, 82–96.
10. KRAUSS, M., HOLLENDER, J., OLLENDER, J., *Analysis of nitrosamines in wastewater: exploring the trace level quantification capabilities of a hybrid linear ion trap/orbi-trap mass spectrometer*, Anal. Chem. 80, Switzerland ,2008, 834–842.2
11. FIDDLER, W., and PENSABENE, J. W. *Supercritical fluid extraction of volatile N-nitrosamines in fried bacon and its drippings: method of comparison*. Journal of AOAC International, 79(4), Philadelphia, PA 19118, USA, 1996, 895–901.
12. ANDRADE, R., REYES, F. G and RATH, S. *A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA*. J. Food Chem, 91, Brazil, 2005, 173-179
13. SHIBAMOTO, T. *Chromatographic analysis of environmental and food toxicants.* Marcel Dekker, New York, 1998, 77.
14. MATYSKA, M.T, PESEK, J. J and Yang, L. *Screening method for determining the presence of N-nitrosodiethanolamine in cosmetics by open-tubular capillary electrochromatography*. J. Chromatogr A 887,USA, 2000, 487–503
15. MA, H., WANG, M., PU, C., ZHANG, J., ZHAO, S., Yao, S and XIONG, J., *Transient and steady state photolysis of p-nitroaniline in aqueous solution*. J. Hazardous Materials 165 (1e3), Shanghai, PR China, 2009, 867-873.
16. POZZI, R., BOCCHINI, P., PINELLI, F., and GALLETTI, G. C. *Determination of nitrosamines in water by gas chromatography/chemical ionization/selective ion trapping mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 1218, Bologna, Italy, 2011, 1808–1814.
17. Scientific Research Index,Syrian Arab Republic Ministry of Education - Al-Assad National Library 10 April. 2010." http://www.alassad-library.gov.sy/index.php"
18. ALKSEEM, M.; KARABEET, F; ALSSAF, Z. *Rapid and Simple Extraction Method for Volatile N-nitrosamines in meat products*.J.Pharmacology&Pharmacy, in press (accepted in 1/10/2013), USA.
19. PS15 ,*Guide to Method Validation for Quantitative Analysis in Chemical Testing Laboratories*, Irish National accreditation Board , Ireland , Issue 3 April 2012,