

میکرواستخراج نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های سوسیس و کالباس موجود در بازار تهران و تعیین

مقدار آن‌ها با استفاده از کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتری جرمی

حورا رضائی¹، مرضیه کمانکش²، هدایت حسینی³، وحید قاسم زاده محمدی⁴، عبدالرضا محمدی⁵

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 2- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه شیمی، دانشگاه الزهراء تهران، ایران
- 3- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 4- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 5- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: ab.mohammadi@sbmu.ac.ir

تاریخ دریافت: 92/10/17

تاریخ پذیرش: 92/12/12

چکیده

سابقه و هدف: در فرآیند تولید فرآورده‌های گوشتی به سبب وجود نیتريت و ترکیبات آمیني موجود در بافت ماده غذایی، نیتروز آمین‌ها تولید می‌شوند که این ترکیبات دارای خاصیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی می‌باشند. هدف از این پژوهش، معرفی و بهینه‌سازی روش استخراج به کمک ماکروویو به همراه میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به عنوان یک روش سریع، کم هزینه و دقیق جهت تعیین نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های سوسیس و کالباس عرضه شده در شهر تهران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: عوامل مؤثر بر استخراج نیتروز آمین‌ها به کمک روش سطح پاسخ بهینه گردید. جهت بهینه‌سازی از طرح مرکب مرکزی با 6 تکرار در نقطه مرکزی استفاده گردید. ارقام شایستگی روش پیشنهادی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. شناسایی و تعیین مقدار نیتروز آمین‌های موجود در 18 نمونه‌ی تهیه شده از 3 کارخانه‌ی معتبر شهر تهران با استفاده از روش پیشنهادی انجام گرفت. روش آماری مورد استفاده در این پژوهش آنالیز واریانس یک طرفه می‌باشد.

یافته‌ها: مقادیر بهینه مربوط به حجم حلال استخراجی: 100 μ L، حجم حلال پخشی: 500 μ L، مقدار نمک: 1/1 گرم (11%) و pH= 7/5 تعیین گردید. ارقام شایستگی روش پیشنهادی در شرایط بهینه در گستره‌ی بسیار مطلوب قرار داشت. در پژوهش حاضر، کمترین و بیشترین مقدار نیتروز آمین در نمونه‌های سوسیس و کالباس عرضه شده در شهر تهران به ترتیب 0/465 ng g⁻¹ و 195 ng g⁻¹ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: کارایی و قابلیت اعتماد روش استخراج به کمک ماکروویو به همراه میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به عنوان یک روش ساده و سریع جهت تعیین مقادیر بسیار کم نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های سوسیس و کالباس در مقایسه با سایر روش‌های قبلی اثبات گردید.

واژگان کلیدی: سوسیس و کالباس، نیتروز آمین‌ها، استخراج به کمک ماکروویو، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتری جرمی

• مقدمه

سوسیس و کالباس در بازار عرضه می‌گردند. یکی از اصلی‌ترین راه‌های فرآوری محصولات گوشتی استفاده از نیترات و نیتريت می‌باشد. این ترکیبات سبب افزایش مدت زمان ماندگاری و همچنین جلوگیری از فساد محصولات مذکور در طول زمان نگهداری می‌شوند (1، 2)، واکنش بین

گوشت و فرآورده‌های گوشتی به عنوان جزء اصلی رژیم غذایی و تامین‌کننده‌ی بخش وسیعی از نیازهای پروتئینی، ویتامینی و املاح مورد نیاز بدن انسان محسوب می‌شوند. بیشترین تولید فرآورده‌های گوشتی در ایران مربوط به انواع فرآورده‌های حرارت دیده می‌باشند، که تحت عنوان

نیتروز آمین‌ها با سرعت زیاد و در زمان کوتاه محقق می‌گردد. از جمله روش‌های استخراجی که برای تعیین و شناسایی نیتروز آمین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است استخراج مایع مایع (LLE) (4) و نیز استخراج فاز جامد (SPE) (14) می‌باشند.

امروزه روش‌های استخراجی فوق به دلیل مصرف زیاد حجم حلال آلی و نیاز به حلال پراکنی آن و در نتیجه امکان هدر رفت آنالیت و همچنین طولانی بودن مدت زمان انجام آزمایش، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات در جهت حذف و یا تقلیل معایب فوق منجر به استفاده از روش‌های میکرواستخراجی از جمله تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به منظور استخراج و تعیین دقیق مقادیر بسیار کم انواع گونه‌ها در بافت‌های مختلف نمونه انجام پذیرفته است (15-17). تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی (Dispersive Liquid Liquid Microextraction) اولین بار توسط اسدی و همکاران در سال 2006 و به منظور شناسایی ترکیبات آلی در آب مورد استفاده قرار گرفت (18). اساس این تکنیک بر مبنای سه فاز مایع شامل نمونه-ی آبی، حلال استخراجی و حلال پخش‌کننده می‌باشد. در این روش آنالیت مورد نظر از فاز آبی به حلال استخراجی انتقال می‌یابد. نقش حلال پخش‌کننده که خود باید امتزاج پذیری مناسبی با دو محیط آبی و آلی داشته باشد، تسهیل خروج آنالیت از محیط آبی و راه‌یابی هرچه بیشتر گونه‌ی مورد نظر به فاز استخراجی می‌باشد. از جمله مزایای این تکنیک می‌توان به حساسیت و گزینش‌پذیری بالای روش، بازده بالای استخراج، سرعت زیاد و استفاده از حجم کم حلال آلی اشاره کرد.

هدف از این تحقیق، ابداع و معتبرسازی یک روش جدید (MAE-DLLME-GC-MS) به منظور شناسایی و تعیین مقادیر بسیار کم نیتروز آمین‌ها در سوسیس و کالباس می‌باشد. عوامل مؤثر بر استخراج نیتروز آمین‌ها به شیوه‌ی سطح پاسخ و با استفاده از طرح مرکب مرکزی بهینه شدند. همچنین کارایی این روش در استخراج و تعیین مقادیر بسیار کم نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های حقیقی سوسیس و کالباس عرضه شده در شهر تهران محقق گردید.

• مواد و روش‌ها

تهیه‌ی نمونه‌ها: ابتدا به کمک آمار موجود در اداره‌ی نظارت بر مواد غذایی 3 کارخانه‌ی دارای مجوز رسمی فرآورده‌های گوشتی حرارت دیده که بیشترین عرضه را در

آمین‌های نوع دوم موجود در ماده‌ی غذایی و نیترات و نیتريت افزوده شده به آن منجر به تشکیل ترکیبات فرار نیتروز آمین می‌شود (3). تشکیل نیتروز آمین‌ها به روش پخت، دما، زمان، غلظت نیتريت افزوده شده و... بستگی دارد (4، 2). تاکنون از بین 300 نوع مختلف نیتروز آمین شناخته شده، سرطان‌زایی 91 درصد آن‌ها به اثبات رسیده است. نیتروز آمین‌ها قادرند از طریق خون به کبد راه یافته و سریعاً متابولیزه شوند و اثرات سرطان‌زایی خود را از طریق آسیب به DNA ظاهر سازند (5-7). نیتروز آمین‌ها به دو دسته فرار و غیر فرار تقسیم می‌گردند. از مهم‌ترین نیتروز آمین‌های فرار شناخته شده در سوسیس و کالباس که توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان (IARC) به عنوان ترکیبات سرطان‌زای احتمالی برای انسان طبقه‌بندی شده‌اند می‌توان به موارد زیر اشاره کرد (8، 9):

N-nitrosodimethylamine (NDMA)

N-nitrosodiethylamine (NDEA)

N-nitrosodibutylamine (NDBA)

N-nitrosopiperidine (NPIP)

N-nitrosopyrrolidine (NPYR)

حداکثر غلظت مجاز تعیین شده برای این ترکیبات در فرآورده‌های غذایی متغیر است و برای مثال در مورد ترکیب NPYR 10 میکروگرم در کیلوگرم وزن بدن هر انسان در روز گزارش شده است (10). تعیین میزان نیتروز آمین‌ها در فرآورده‌های گوشتی به سبب اثرات قابل توجه سمیت و سرطان‌زایی این ترکیبات و همچنین با توجه به مصرف بالا و روزافزون سوسیس و کالباس در کشور از اهمیت بالایی برخوردار است. اندازه‌گیری غلظت نیتروز آمین‌ها در فرآورده‌های گوشتی می‌تواند به عنوان یک معیار جهت ارزیابی کیفیت تغذیه‌ای و نیز تعیین کیفیت فرآورده‌های فرآوری و حرارتی مختلف مورد توجه قرار گیرد (11).

به منظور تعیین و شناسایی نیتروز آمین‌ها در انواع مختلف مواد غذایی از روش‌های متعدد دستگاهی از جمله کروماتوگرافی گازی بهره گرفته می‌شود (11-13). به دلیل وجود انواع ناخالصی و مزاحمت در بافت نمونه به ویژه نمونه‌های جامد، شناسایی و تعیین نیتروز آمین‌ها نیازمند به کارگیری مراحل استخراج متعدد قبل از به کارگیری روش‌های دستگاهی می‌باشد. جهت ساده سازی و تسریع فرآیند استخراج اولیه، استخراج به کمک امواج ماکروویو بسیار مؤثر می‌باشد. در این روش به دلیل تابش هم زمان امواج ماکروویو از همه‌ی جهات به تمام قسمت‌های نمونه و افزایش سریع دمای آن، فرآیند استخراج مقادیر بسیار کم

هر یک از پارامترها به منظور طراحی تعداد آزمایش‌های مورد نیاز از نرم افزار Design expert v. 8.0.5 محصول شرکت استیت ایز (Minneapolis, USA) استفاده گردید که به طراحی 30 آزمایش انجامید. آزمایش‌ها با تعداد تکرار 3 بار انجام گرفت و در نهایت نیز نسبت سطح زیر منحنی مجموع نیتروز آمین‌ها به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی (سطح زیر منحنی نسبی) به عنوان پاسخ نهایی گزارش شد. داده‌های مربوط به اندازه‌گیری نیتروز آمین‌ها با استفاده از نرم افزار Excell تجزیه و تحلیل شدند.

آزمون‌های معتبرسازی روش اندازه‌گیری MAE-DLLME-GC-MS برای تعیین نیتروز آمین‌ها:

به منظور رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین گستره‌ی خطی روش، محلول‌های آبی مخلوط هفت استاندارد نیتروز آمین (نیتروزودی متیل آمین، نیتروزومتیل اتیل آمین، نیتروزودی- اتیل آمین، نیتروزوپیرولیدین، نیتروزوپیریدین، نیتروزودی بوتیل آمین و نیتروزودی فنیل آمین) در غلظت‌های 5، 10، 20، 50، 100، 150 و 200 نانوگرم بر میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت. انحراف استاندارد نسبی روش، با انجام 5 آزمایش تکراری با استفاده از نمونه‌ی سوسیس که غلظت نیتروز آمین‌ها در آن 50 ng mL^{-1} بود، تحت شرایط بهینه انجام پذیرفت. محاسبه‌ی درصد بازیافت روش با استفاده از نمونه‌ی سوسیس تهیه شده‌ای که غلظت 50 ng mL^{-1} از نیتروز آمین‌ها در آن به صورت دستی اضافه شده بود، محاسبه گردید. به منظور محاسبه فاکتور تغلیظ، محلول استاندارد مخلوط نیتروز آمین‌ها با غلظت‌های 5، 10، 20، 40 میلی گرم در لیتر در متانول تهیه شد. از هر یک از محلول‌ها 3 میکرولیتر به طور مستقیم به دستگاه GC تزریق گردید و منحنی کالیبراسیون به دست آمد. حد تشخیص (LOD) براساس 3 S/N و حد اندازه‌گیری (LOQ) بر پایه‌ی 10 S/N محاسبه شد.

شهر تهران دارند انتخاب شدند. محصولات انتخابی از هر کارخانه در دو نوع سوسیس و کالباس گوشت قرمز و گوشت مرغ با درصد‌های مختلف گوشت متداول با مصرف زیاد (40، 55، 60، 70 و 90 درصد) می‌باشند. بلافاصله پس از تهیه، نمونه‌ها به آزمایشگاه منتقل و تا زمان آنالیز در یخچال تحت دمای 4 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. استخراج و آنالیز تمام نمونه‌ها در روز 14 پس از تولید انجام گرفت.

مواد شیمیایی و استانداردها: اتانول، کلروفرم، متانول، هیدروکسید پتاسیم، هیدروکلریک اسید، کلرید سدیم، پتاسیم هگزا فروسیانید و استات روی، همگی با بالاترین درجه‌ی خلوص از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) خریداری شدند.

محلول استاندارد اولیه‌ی نیتروز آمین‌ها در غلظت $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ تهیه گردید. دیگر محلول‌های استاندارد از حل کردن مقدار مناسبی از محلول استاندارد اولیه در متانول تهیه شدند. بی فنیل (خریداری شده از شرکت مرک آلمان) در غلظت $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ به عنوان استاندارد داخلی مورد استفاده قرار گرفت. جهت تهیه محلول کارز 1، 10/6 گرم پتاسیم هگزا فروسیانید در 100 میلی لیتر آب مقطر حل شد. همچنین به منظور تهیه‌ی محلول کارز 2، 21/9 گرم استات روی به همراه 3 میلی لیتر اسید استیک در بالن 100 میلی لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد. همه‌ی مواد شیمیایی و استانداردها در دمای یخچال نگهداری شدند.

طراحی آزمایش و بهینه سازی عوامل مؤثر بر استخراج به روش سطح پاسخ: بهینه‌سازی متغیرهای مورد نظر (حجم حلال استخراجی، حجم حلال پخشی، pH و مقدار نمک) با هدف کسب شرایط بهینه، به کمک روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology) و با استفاده از طرح مرکب مرکزی (Central composite design) در 5 سطح مختلف برای هر متغیر انجام پذیرفت (جدول 1 این داده‌ها را نشان می‌دهد). پس از انتخاب سطوح مختلف برای

جدول 1. فاکتورها و سطوح بهینه‌سازی آن‌ها

متغیر	سطوح				
	$+\alpha$	+1	0	-1	$-\alpha$
A حجم حلال پخشی (میکرولیتر)	1000	825	650	475	300
B حجم حلال استخراجی (میکرولیتر)	150	127/5	105	82/5	60
C pH	9	7/5	6	4/5	3
D نمک (گرم)	1/5	1/135	0/75	0/375	0

• یافته‌ها

از جمله پارامترهای مؤثر بر فرآیند میکرواستخراج نیتروز آمین در نمونه‌های سوسیس و کالباس، نوع و حجم حلال استخراجی، نوع و حجم حلال پخش کننده، pH محلول نمونه و مقدار نمک می‌باشند.

نوع حلال استخراجی و پخشی: در به کارگیری تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده و نوع حلال پخشی در مقدار استخراج آنالیت تأثیرگذار می‌باشند. به منظور انتخاب نوع حلال استخراجی مناسب، سه نوع حلال استخراجی کلروفرم، تترا کلرواتیلن و تتراکلرید کربن تحت شرایط یکسان مورد آزمایش قرار گرفتند. مقایسه سطح زیر پیک نیتروز آمین برای سه حلال استخراجی مذکور نشان داد که کلروفرم بیشترین کارایی استخراج را داشته و رفتار کروماتوگرافی بهتری را در استخراج نیتروز آمین در مقایسه با حلال‌های دیگر نشان می‌دهد. با هدف انتخاب بهترین نوع حلال پخشی نیز سه نوع حلال استونیتریل، اتانول و استون مورد ارزیابی قرار گرفتند که نتایج، بالا بودن درصد استخراج را با به کارگیری حلال اتانول نشان داد. بنابراین کلروفرم و اتانول به ترتیب به عنوان حلال استخراجی و حلال پخشی مناسب مورد استفاده قرار گرفتند.

نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر استخراج با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM): عوامل مؤثر بر کارایی روش میکرواستخراج شامل حجم حلال پخشی، حجم حلال استخراجی، pH و مقدار نمک با استفاده از طرح مرکب مرکزی بهینه شدند. مطابق این طرح 30 آزمایش با 6 بار تکرار نقطه مرکزی انجام شد. آزمایش‌های مذکور انجام و پاسخ‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Design Expert تحلیل شد. پس از رگرسیون درجه دوم، معادله زیر برای ارزیابی پاسخ کل مجموع سطح زیر منحنی نسبی تمام ترکیبات استخراجی بر حسب مقادیر کد شده به دست آمد:

$$Y = +1.68 - 0.045A + 0.22B + 0.18C + 0.11D + 0.019AB - 0.056AC - 0.016AD + 0.030BC + 0.063BD - 0.048CD - 0.053A^2 - 0.11B^2 - 0.054C^2 - 0.088D^2$$

$Y =$ مجموع سطح زیر منحنی نسبی تمام ترکیبات نیتروز آمین استخراجی، A: حجم حلال پخشی B: حجم حلال استخراجی C: pH و D: مقدار کلرید سدیم می‌باشد. با در نظر گرفتن این معادله و نیز با توجه به علامت و ضرایب به دست آمده برای هر متغیر می‌توان چنین نتیجه گرفت که حجم حلال استخراجی و حجم حلال پخشی به

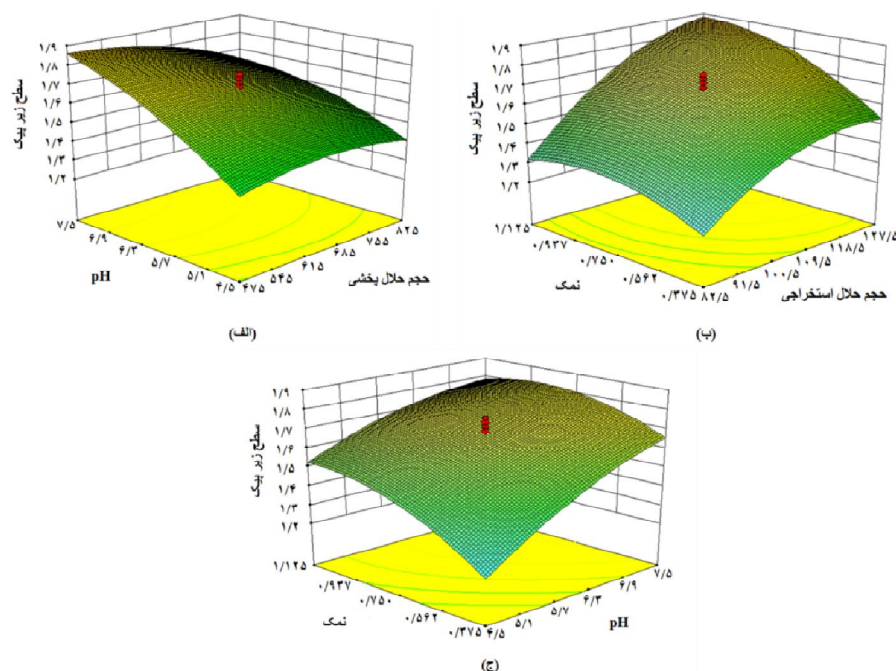
آنالیز نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های سوسیس و کالباس:

استخراج نیتروز آمین‌ها از نمونه‌های سوسیس و کالباس در نقاط بهینه‌ی به دست آمده (مقدار کلروفرم 100 میکرولیتر، مقدار اتانول 500 میکرولیتر، مقدار کلرید سدیم 1/1 گرم و pH برابر 7/5) انجام پذیرفت. ابتدا 15 گرم از هر یک از نمونه‌های سوسیس و کالباس وزن گردید و توسط چرخ گوشت چرخ شد. سپس نمونه چرخ شده با 10 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید و 1/5 گرم از آن در ظرف شیشه‌ای درب‌دار توزین شد. سپس مقدار 10 میلی‌لیتر حلال هیدرولیزی (متانول مخلوط شده با هیدروکسید پتاسیم 2 مولار به ترتیب با نسبت 20 و 80 درصد) به آن اضافه گردید. به منظور تخریب و خروج بهتر ترکیبات مورد نظر، ظرف حاوی نمونه به مدت 1/5 دقیقه در معرض امواج مایکروویو قرار گرفت. پس از خنک شدن ظرف، نمونه به فالكون پلاستیکی 50 میلی‌لیتری انتقال یافت و به مدت 5 دقیقه و با سرعت 4000 دور در دقیقه تحت عمل سانتریفیوژ قرار گرفت. پس از این مرحله، فاز شفاف رویی به فالكون دیگری منتقل شد و pH آن با استفاده از هیدروکلریک اسید (0/5 مولار) به عدد 7/5 رسانده شد. سپس 1 میلی‌لیتر محلول کارز 1 (پتاسیم هگزا فروسیناید) و 1 میلی‌لیتر محلول کارز 2 (استات روی) جهت ته‌نشینی پروتئین‌ها به آن اضافه شد. مخلوط حاصل مجدداً سانتریفیوژ گردید (به مدت 5 دقیقه و سرعت 4000 rpm). پس از جدا نمودن رسوبات ته‌نشین شده در ته فالكون از محلول شفاف رویی، این محلول جهت انجام فرآیند ریزاستخراج به فالكون 15 میلی‌لیتری انتقال داده شد. به منظور فرآیند ریزاستخراج مایع مایع پخشی، ابتدا 11 درصد نمک کلرید سدیم به آن اضافه گردید و با استفاده از هم‌زن به خوبی مخلوط شد. سپس 100 میکرولیتر کلروفرم (حلال استخراجی) به همراه $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ استاندارد داخلی بی فنیل و 500 میکرولیتر اتانول (حلال پخشی) به محلول اضافه گردید. محلول حاصل ابری شد و استخراج نیتروز آمین به درون فاز آلی انجام پذیرفت. جهت جداسازی فازها، نمونه به مدت 10 دقیقه و تحت سرعت 4000 rpm سانتریفیوژ شد. ابتدا فاز مایع بالایی جدا گردید سپس با استفاده از سرنگ 10 میکرولیتری 3 میکرولیتر از فاز آلی ته‌نشین شده، شامل آنالیت مورد نظر به طور مستقیم به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد.

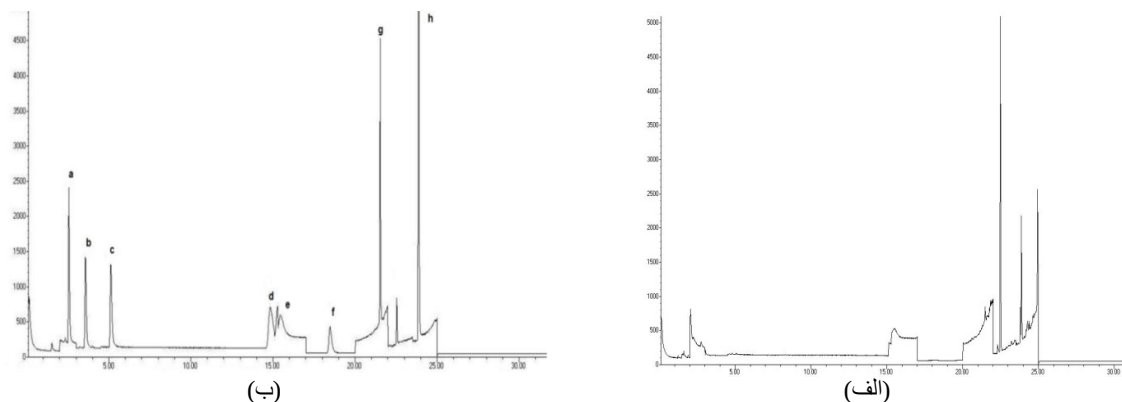
استخراج را می‌توان در حجم حلال پخشی 500 میکرولیتر و pH 7/5 مشاهده کرد. شکل 1-ب برهم‌کنش بین حجم حلال استخراجی و مقدار نمک را نشان می‌دهد. با افزایش میزان نمک تا 11 درصد و افزایش حجم حلال استخراجی تا 100 میکرولیتر، بیشترین مقدار پاسخ به دست خواهد آمد. شکل 1-ج سطح پاسخ را به عنوان تابع نمک و pH نشان می‌دهد و روند افزایشی پاسخ با افزایش غلظت نمک تا 11 درصد و کاهش pH تا 7/5 مشهود است.

ترتیب اثر مثبت و منفی قابل توجهی در راندمان استخراج دارند.

در به کارگیری طراحی آزمایش علاوه بر امکان پیشگویی مقدار بهینه‌ی متغیرها و نیز بررسی جداگانه‌ی اثر هر کدام از آن‌ها در راندمان استخراج، می‌توان برهم‌کنش‌های موجود بین متغیرها را در قالب نمودار سه بعدی مشاهده کرد. شکل 1-الف اثر ترکیبی حجم حلال پخشی و pH بر روی پاسخ نشان می‌دهد. براساس این شکل بیشترین درصد



شکل 1. نمودار سه بعدی برهم‌کنش بین متغیرهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج نیتروزآمین‌ها. الف: حجم حلال پخشی و PH. ب: حجم حلال استخراجی و مقدار نمک. ج: مقدار نمک و PH



شکل 2. کروماتوگرام حاصل از استخراج توسط روش MAE-DLLME-GC-MS در حالت SIM. الف (بدون تزریق استاندارد) و نمونه ب (با تزریق استاندارد) از غلظت 40 ng g^{-1} نیتروزآمین‌ها

(a) (NDMA), (b) (NMEA), (c) (NDEA), (d) (NPYR), (e) (NPIP), (f) (NDPA), (g) biphenyl (IS), (h) N- (NDPheA)

گستره 3/5-5/4% قرار دارد. حد تشخیص روش پیشنهادی برای نیتروز آمین ها $0/1-0/5 \text{ ng g}^{-1}$ و حد اندازه گیری $0/1-0/5 \text{ ng g}^{-1}$ می باشد. درصد بازیافت نسبی روش پیشنهادی برای نیتروز آمین های مختلف 83/9-109/4 به دست آمد. مقدار فاکتور تغلیظ بین 126 تا 152 می باشد. همچنین مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی با سایر روش ها در جدول 3 نشان داده شده است.

ارقام شایستگی روش MAE-DLLME-GC-MS جهت تعیین نیتروز آمین ها: نتایج حاصل از معتبر سازی روش MAE-DLLME-GC-MS در جدول 2 آورده شده است. بررسی منحنی های کالیبراسیون ترکیبات نیتروز آمین در آب نشان می دهد که این منحنی ها با ضریب همبستگی بالا $R^2=(0/96-0/99)$ در محدوده غلظتی $0/1-200 \text{ ng ml}^{-1}$ به صورت خطی می باشند. انحراف استاندارد نسبی روش در

جدول 2. ارقام شایستگی روش پیشنهادی

نمونه	آنالیت	ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%)	درصد بازیابی	حد تشخیص (ng g^{-1})	حد تعیین (ng g^{-1})	فاکتور تغلیظ	گستره ی خطی (ng mL^{-1})
سوسیس و کالباس	NDMA	0/9803	3/5	108	0/5	1/4	131/8	0/1-200
	NMEA	0/9881	3/6	109	0/4	1/4	152/8	0/1-200
	NDEA	0/9909	5/4	109	0/3	1/0	144/0	0/1-200
	NPYR	0/9633	3/9	93	0/2	0/9	148/1	0/1-200
	NPIP	0/9954	4/3	92	0/2	0/8	140/1	0/1-200
	NDBA	0/9962	4/7	88	0/1	0/4	142/5	0/1-200
	NDPheA	0/9799	4/8	83	0/1	0/6	126/0	0/1-200

جدول 3. مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش ها

روش	نوع نمونه	آنالیت	گستره ی خطی (ng mL^{-1})	حد تعیین (ng g^{-1})	حد تشخیص (ng g^{-1})	درصد بازیابی	انحراف استاندارد نسبی (%)	ضریب همبستگی
روش پیشنهادی	سوسیس و کالباس	NDMA	0/1-200	4/59	1/38	108/69	3/5	0/9803
		NMEA	0/1-200	4/09	1/23	109/40	3/6	0/9881
		NDEA	0/1-200	3/56	1/07	109/10	5/4	0/9909
		NPYR	0/1-200	3/92	1/064	93/87	3/9	0/9633
		NPIP	0/1-200	11/54	3/46	72/13	4/3	0/9954
		NDBA	0/1-200	5/33	1/6	78/32	4/68	0/9962
		NDPheA	0/1-200	4/883	1/45	83/99	4/8	0/9799
	میکرواستخراج فاز جامد پخشی (13)	NDMA	25-500	0/36	0/12	84	7	0/999
		NMEA	25-500	0/18	0/06	74	4	0/999
		NDEA	25-500	0/18	0/06	80	7	0/999
		NPYR	25-500	0/18	0/06	99	4	0/999
		NDPA	25-500	0/09	0/03	98	8	0/999
		NPIP	25-500	0/09	0/03	83	2	0/999
		NDBA	25-500	0/03	0/01	105	7	0/999
	کروماتوگرافی گازی - آشکارسازی لومینسانس هیدروژنی (19)	NDMA	-	16/71	3/86	-	-	0/967
		NDEA	-	10/04	2/32	-	-	0/982
		NDPA	-	6/96	1/61	-	-	0/996
		NPYR	-	9/30	2/15	-	-	0/968
		NPIP	-	8/56	1/98	-	-	0/973
		NDBA	-	10/63	2/46	-	-	0/971
	کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتری جرمی (20) ماهی	NDMA	-	0/37	0/11	79	9/4	-
		NDEA	-	0/33	0/10	82	8/4	-
		NPYR	-	0/35	0/11	87	8/4	-
		NPIP	-	0/34	0/10	86	8/1	-
		NDBA	-	0/33	0/10	88	7/7	-

شده است. همچنین صحت روش با استفاده از مقدار مشخص اضافه شده به نمونه‌های انتخابی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. شکل 2 کروماتوگرام به دست آمده از تکنیک MAE-DLLME-GC-MS تحت شرایط الف (بدون تزریق استاندارد) و نمونه ب (با تزریق استاندارد) از غلظت 40 ng g^{-1} نیتروزآمین‌ها می‌باشد.

غلظت نیتروزآمین‌ها در انواع نمونه‌های سوسیس و کالباس: به منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی، 18 نمونه‌ی مختلف از 3 کارخانه‌ی مهم عرضه کننده فرآورده‌های گوشتی در تهران تهیه گردیدند و تحت فرآیند MAE-DLLME-GC-MS با 3 تکرار قرار گرفتند و مقادیر میانگین یافت شده از نیتروزآمین‌های موجود در نمونه‌ها گزارش گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول 4 آورده

جدول 4. نتایج حاصل از استخراج نیتروزآمین‌ها در سوسیس و کالباس تولید 3 کارخانه در تهران با استفاده از روش پیشنهادی میانگین غلظت ($\pm \text{SD}$ بر حسب نانوگرم بر گرم)

کارخانه	نوع محصول	NDMA	NMEA	NDEA	NPYR	NIPI	NBBA	NDpA
A	کالباس گوشت 60%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	14/7 $\pm$ 1/14
	کالباس گوشت 90%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	13/4 $\pm$ 0/98
	کالباس مرغ 90%	ND	ND	ND	ND	ND	149/8 $\pm$ 12/39	17/2 $\pm$ 1/27
	کوکتل گوشت 55%	ND	ND	ND	ND	10/1 $\pm$ 0/98	19/1 $\pm$ 1/29	63/0 $\pm$ 4/24
	کوکتل مرغ 55%	ND	ND	ND	2/15 $\pm$ 58/2	ND	17/7 $\pm$ 1/09	106/4 $\pm$ 8/66
	کوکتل گوشت 70%	ND	ND	ND	0/74 $\pm$ 9/6	38/2 $\pm$ 4/21	24/8 $\pm$ 1/97	99/1 $\pm$ 6/93
B	کالباس گوشت 60%	ND	ND	ND	7/5 $\pm$ 0/64	15/1 $\pm$ 1/94	10/3 $\pm$ 0/83	7/5 $\pm$ 0/65
	کالباس گوشت 90%	ND	ND	ND	ND	10/4 $\pm$ 0/74	44/6 $\pm$ 4/29	6/4 $\pm$ 0/42
	کالباس مرغ 90%	ND	ND	ND	22/3 $\pm$ 1/18	12/9 $\pm$ 1/08	12/8 $\pm$ 1/07	3/3 $\pm$ 0/29
	کوکتل گوشت 55%	ND	ND	ND	ND	5/1 $\pm$ 0/39	54/0 $\pm$ 3/56	8/3 $\pm$ 0/41
	کوکتل مرغ 55%	ND	ND	ND	ND	7/3 $\pm$ 0/45	ND	2/4 $\pm$ 0/17
	کوکتل گوشت 70%	ND	ND	ND	17/7 $\pm$ 1/42	17/8 $\pm$ 0/88	87/6 $\pm$ 5/51	2/4 $\pm$ 0/16
C	کالباس گوشت 60%	ND	ND	ND	ND	12/3 $\pm$ 0/83	ND	128/4 $\pm$ 9/34
	کالباس گوشت 90%	ND	ND	ND	ND	139/3 $\pm$ 8/64	27/5 $\pm$ 2/59	9/0 $\pm$ 0/76
	کالباس مرغ 90%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	کوکتل گوشت 55%	ND	ND	ND	ND	132/4 $\pm$ 14/47	ND	6/8 $\pm$ 0/43
	کوکتل مرغ 55%	ND	ND	ND	139/9 $\pm$ 8/78	106/0 $\pm$ 7/94	ND	2/4 $\pm$ 0/19
	کوکتل گوشت 70%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: یافت نشد

• بحث

بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر میکرواستخراج با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM): رویه سطح پاسخ معمولاً برای بررسی اثر ترکیبی چندین متغیر به منظور یافتن شرایط بهینه برای یک سامانه چند متغیره به کار می‌رود. از آنجایی که موقعیت نقطه بهینه قبل از انجام آزمایش‌های مربوط به روش سطح پاسخ معلوم نیست، برتری با طرحی است که دقت برآورد مشابهی را در تمام جهات تأمین کند.

در این روش علاوه بر مشاهده‌ی اثر خطی متغیرها روی پاسخ، اثر متقابل و درجه دوم آن‌ها نیز نشان داده می‌شود. همان‌طور که در بخش یافته‌ها مشخص شد، مدل درجه دوم روی داده‌ها منطبق گردید. میزان انطباق مدل روی داده‌های واقعی توسط ضریب تعیین R^2 و Adjusted- R^2 نشان داده می‌شود. R^2 بالاتر از 0/96 و Adjusted- $R^2=0/96$ گویای رابطه‌ای قوی بین داده‌های

استخراج نیتروز آمین‌ها از انواع نمونه‌های سوسیس و کالباس را دارا می‌باشد.

کارایی روش در نمونه‌های حقیقی: جهت بررسی مناسب بودن روش ارائه شده برای شناسایی نیتروز آمین‌ها در نمونه‌های حقیقی، 18 نوع از محصولات گوشتی 3 کارخانه، شامل سوسیس و کالباس دارای درصدهای مختلفی از گوشت قرمز یا مرغ، در شرایط بهینه مورد ارزیابی قرار گرفتند. غلظت برخی از نیتروز آمین‌ها در نمونه‌ها ناچیز بوده و نتایج تجزیه‌ای آن‌ها با روش افزایش استاندارد مورد تأیید قرار گرفت. بررسی میزان تغییرات نیتروز آمین‌ها نشان می‌دهد که روند تغییر این ترکیبات در طول مدت نگهداری محصول در دمای 4 درجه افزایشی است. بررسی‌های انجام شده نشان داد که مقدار نیتروز آمین تشکیل شده در فرآورده‌های گوشتی به میزان نیتريت افزوده شده و همچنین نیتريت باقیمانده در محصول بستگی دارد (21). نتایج به دست آمده با بکارگیری تست آنالیز واریانس یک طرفه جهت بررسی محصولات با درصد گوشت متفاوت نشان داد که میزان تشکیل نیتروز آمین در سوسیس‌ها (با قطر کمتر) بیشتر از نمونه‌های کالباس (با قطر بیشتر) است. از آنجایی که طول مدت زمان پخت در کارخانه برای کالباس به طور متوسط 5-6 ساعت بوده و از مدت زمان 1-2 ساعته لازم برای پخت سوسیس بیشتر است و با توجه به اینکه فرایند پخت می‌تواند اثر قابل توجهی بر کاهش نیتريت افزوده شده داشته باشد، می‌توان این امر را دلیل اختلاف در مقدار نیتروز آمین تشکیل شده بین این دو محصول دانست. یعقوبی‌فر و همکاران نیز در سال 2009 در مطالعه‌ای بر روی سوسیس و کالباس‌های عرضه شده در سبزواری نشان دادند که میزان کاهش نیتريت سدیم در فرآورده‌های گوشتی امولسیونه با قطر کمتر (سوسیس)، کمتر از فرآورده‌های با قطر بیشتر (کالباس) است (22). در بررسی سوسیس و کالباس‌های مورد مطالعه مشخص شد که مقدار نیتريت افزوده شده در برخی از این نمونه‌ها بیش از حد مجاز استاندارد بود که این امر یافته‌های میرزایی و همکاران را تایید می‌نماید (23).

در تحقیق حاضر، استخراج سریع و ساده‌ی مقادیر بسیار کم نیتروز آمین‌ها با به کارگیری روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) حاصل شد. به کارگیری این روش سبب افزایش دقت و حساسیت و نیز آسانی عمل، کاهش مصرف حلال‌های آلی سمی و کاهش زمان استخراج آنالیت مورد نظر

واقعی و مدل پیشنهادی می‌باشد. در این مدل p -value کمتر از 0/0001 و F -value= 50/97 است. نمودارهای سه بعدی اثرات متقابل متغیرها را بر پاسخ به خوبی نشان می‌دهند. بیشترین بازده استخراج در حجم 500 میکرولیتر از اتانول و pH مساوی 7/5 به دست آمد. مطابق پژوهش‌های پیشین (15، 16) استفاده از حجم‌های بالاتر از 500 میکرولیتر اتانول سبب افزایش حلالیت نیتروز آمین‌ها در نمونه‌ی آبی و کاهش کارایی استخراج می‌گردد. احتمالاً pH برابر با 7/5 باعث ایجاد یک ساختار غیر یونی در نیتروز آمین‌ها می‌شود. در نتیجه انتقال نیتروز آمین‌ها به حلال استخراجی آسان‌تر صورت می‌پذیرد. افزایش غلظت نمک تا 11 درصد، سطح زیر منحنی برای هر یک از نیتروز آمین‌ها را افزایش می‌دهد. این امر به دلیل اثر salting out و در نتیجه افزایش تمایل نیتروز آمین‌ها به استخراج در حلال آلی در اثر افزایش قدرت یونی محلول آبی می‌باشد (17). اثر تداخلی معنی‌دار بین غلظت نمک و مقادیر pH نیز در این مدل مشاهده گردید. در اینجا نیز بیشترین مقدار استخراج از نیتروز آمین‌ها در 11 درصد نمک و pH برابر با 7/5 به دست آمد.

معتبرسازی روش MAE-DLLME-GC-MS جهت تعیین نیتروز آمین در سوسیس و کالباس: جهت معتبرسازی یک روش جدید، ارقام شایستگی روش پیشنهادی، شامل تکرارپذیری، گستره‌ی خطی، فاکتور تغلیظ، حد تشخیص و حد تعیین مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت. ضریب همبستگی بالا در گستره غلظت‌های ناچیز نیتروز آمین‌ها مؤید قابلیت کاربرد و اعتماد روش جهت تعیین غلظت‌های کم این ترکیبات در نمونه می‌باشد. دقت و تکرارپذیری مناسب روش نیز به سبب مقادیر کم درصد انحراف استاندارد نسبی به اثبات رسید. با توجه به توافق و نزدیکی بین مقدار اضافه شده نیتروز آمین‌ها با مقدار یافت شده آن‌ها در اکثر نمونه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که صحت روش اندازه‌گیری قابل قبول می‌باشد. حدود تشخیص و تعیین روش پیشنهادی قابلیت کاربرد روش را جهت تعیین مقادیر بسیار ناچیز نیتروز آمین‌ها در فرآورده‌های گوشتی به اثبات رساند. مقادیر قابل قبول درصد بازیافت نسبی روش MAE-DLLME-GC-MS گویای عدم تأثیرپذیری تکنیک پیشنهادی از بافت نمونه در استخراج نیتروز آمین می‌باشد. مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی با روش‌های دیگر نشان می‌دهد که روش پیشنهادی قابلیت بالایی جهت

مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی با روش‌های دیگر نشان می‌دهد که روش پیشنهادی قابلیت بالایی جهت استخراج نیتروزآمین‌ها از انواع نمونه‌های سوسیس و کالباس را دارا است.

سپاسگزاری

از معاونت محترم پژوهشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، به خاطر حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

گردید. همچنین همراه شدن این تکنیک با دستگاه کروماتوگرافی گازی با عملکرد بالا به همراه آشکارساز اسپکترومتری جرمی جهت آنالیز نمونه‌ها، منجر به کسب حد تشخیص‌های بسیار خوب در استخراج ترکیبات مذکور شد. در این مطالعه، بهینه‌سازی پارامترهای تاثیرگذار بر فرآیند ریزاستخراج با استفاده از شیوه‌ی سطح پاسخ (RSM) بر پایه‌ی مدل مختلط مرکزی (CCD) به کار گرفته شد. روش پیشنهادی قابلیت کاربرد جهت شناسایی و تعیین غلظت‌های کم نیتروزآمین‌ها را در نمونه‌های حقیقی دارا می‌باشد.

References

- Noel P, Briand E, Dumont J. Role of nitrite in flavour development in uncooked cured meat products: sensory assessment. *Meat Sci* 1990;28(1):1-8.
- Honikel K-O. The use and control of nitrate and nitrite for the processing of meatproducts. *Meat Sci* 2008;78(1):68-76.
- Masuda M, Mower HF, Pignatelli B, Celan I, Friesen MD, Nishino H, et al. Formation of N-nitrosamines and N-nitramines by the reaction of secondary amines with peroxyxynitrite and other reactive nitrogen species: comparison with nitrotyrosine formation. *Chem Res Toxic* 2000;13(4):3018.
- Drabik-Markiewicz G, Dejaegher B, De Mey E, Impens S, Kowalska T, Paelinck H, et al. Evaluation of the influence of proline, hydroxyproline or pyrrolidine in the presence of sodium nitrite on N-nitrosamine formation when heating cured meat. *Anal Chim Acta* 2010;657(2):123-30.
- Jakszyn P, González CA. Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: a systematic review of the epidemiological evidence. *World J. Gastroenterol* 2006;12 (27): 4296-303.
- Radomski J, Greenwald D, Hearn W, Block N, Woods F. Nitrosamine formation in bladder infections and its role in the etiology of bladder cancer. *The J. urology*, 1978;120(1):48-50
- Byun MW, Ahn HJ, Kim JH, Lee JW, Yook HS, Han SB. Determination of volatile N-nitrosamines in irradiated fermented sausage by gas chromatography coupled to a thermal energy analyzer. *J. Chromatogr. A*, 2004;1054(1):403-7.
- Tricker A, Perkins M, Massey R, Bishop C, Key P, McWeeny D. Incidence of some non-volatile N-nitroso compounds in cured meats. *Food Addit Contam* 1984;1(3):245-52
- Carter R. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. *J. Clin. Pathol*, 1980;33 (1):98.
- USDA. US Code of Federal Regulations, Food Safety and Inspection Service, USDA 2004, Certain other permitted uses, 9 CFR Ch. III (1-1-03 ed).
- Andrade R, Reyes FG, Rath S. A method for the determination of volatile N-nitrosamines in food by HS-SPME-GC-TEA. *Food chem* 2005;91(1):173-9
- Campillo N, Viñas P, Martínez-Castillo N, Hernández-Córdoba M. Determination of volatile nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2011;1218(14):1815-21.
- Huang M-C, Chen H-C, Fu S-C, Ding W-H. Determination of volatile N-nitrosamines in meat products by microwave-assisted extraction coupled with dispersive micro solid-phase extraction and gas chromatography – Chemical ionisation mass spectrometry. *Food Chem* 2013;138(1):227-33.
- Yurchenko S, Mölder U. The occurrence of volatile N-nitrosamines in Estonian meat products. *Food chem* 2007;100(4):1713-21.
- Ghasemzadeh-Mohammadi V, Mohammadi A, Hashemi M, Khaksar R, Haratian P. Microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry for isolation and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked fish. *J. Chromatogr. A*, 2012;1237(0):30-6.
- Kamankesh M, Mohammadi A, Modarres Tehrani Z, Ferdowsi R, Hosseini H. Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design. *Talanta*, 2013;109:46-51.
- Mohammadi A, Tavakoli R, Kamankesh M, Rashedi H, Attaran A, Delavar M. Enzyme-

- assisted extraction and ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high- performance liquid chromatography for determination of patulin in apple juice and method optimization using central composite design. *Analytica chimica acta*. 2013;804:104- 110.
18. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M-R, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J. Chromatogr. A*, 2006;1116(1):1-9.
19. Ozel MZ, Gogus F, Yagci S, Hamilton JF, Lewis AC. Determination of volatile nitrosamines in various meat products using comprehensive gas chromatography-nitrogen chemiluminescence detection. *Food Chem Toxicol* 2010;48(11):3268-73.
20. Yurchenko S, Mölder U. Volatile N-Nitrosamines in various fish products. *Food chem* 2006;96(2):325-33.
21. Sebranek JG, Bacus JN. Cured meat products without direct addition of nitrate or nitrite: what are the issues? *Meat science*. 2007;77(1):136-47
22. Yaghoubifar MA, Shakernejad A, Akaberi, A. Comparison of the Quality and safety of Sausage and Salami with Standards in Sabzevar Iran. *Journal of Sabzevar University of Medical Sciences* 2009; 16(2): 114-120 [in Persian].
23. Mirzaii H, Hoseiny H, Rokny N. Curve of the reduction of nitrite in meat sausages containing 90, 60, 40% meat during storage. *Journal of Iran Food and Sciences* 2007; 4(3): 41-46 [in Persian].

Microextraction and determination of nitrosamines in sausage and salami in Tehran market using gas chromatography-mass spectrometry

Ramezani H¹, Kamankesh M², Hoseiny H³, Ghasemzadeh V⁴, Mohammadi A^{5*}

- 1- M.Sc Student in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 2- M.Sc in Chemistry, Faculty of Science, Alzahra University, Tehran, Iran
- 3- Associate prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
4. Ph.D Student in Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
- 5- *Corresponding author: Assistant prof, Dept. of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: ab.mohammadi@sbm.ac.ir

Received 7 Jun, 2014

Accepted 3 Mar, 2014

Background and Objective: Nitrosamines are produced during processing of meat products from the presence of nitrite and amine compounds; these compounds are mutagenic and carcinogenic. The present study optimized and determined the level of nitrosamines in sausage and salami samples in Tehran markets using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry (MAE-DLLME-GC-MS), which is a fast, low-cost and precise method.

Materials and Methods: The nitrosamine extraction was optimized using response surface methodology and a central composite design with 6 replications at the center point. The figures of merit of the proposed method were then evaluated. The proposed method was used to determine the nitrosamine levels in 18 samples at 3 factories of major producers of meat products in Tehran. One-way ANOVA was the statistical method used in this study.

Results: The optimum volume of extraction solvent (100 µl), disperser solvent (500 µl), salt (11%), and the pH (7.5) were obtained. The figures of merit for the proposed method under optimum conditions were in the appropriate range. The lowest and highest concentrations of nitrosamines in real samples were 0.46 and 195 ng g⁻¹, respectively.

Conclusion: The capability and reliability of MAE-DLLME-GC-MS as a simple and fast method for trace determination of nitrosamines in sausage and salami samples was confirmed over the results of other methods.

Keywords: Sausage and salami, Nitrosamines, Microwave-assisted extraction, Dispersive liquid-liquid microextraction, Gas chromatography-mass spectrometry