Journal of the Korean Chemical Society
2017, *Vol. 61, No. 2*
Printed in the Republic of Korea
https://doi.org/10.5012/jkcs.2017.61.2.51

LC-MS/MS 시스템을 이용한 소변 중 *N*-니트로사민류 분석법 확립

박나연 · 정 웅[†] · 고영림*
을지대학교 보건환경안전학과
[†]경희대학교 의과대학 응급의학과
(접수 2017. 1. 12; 게재확정 2017. 2. 15)

Analysis Method of *N*-Nitrosamines in Human Urine by LC-MS/MS System

Na-Youn Park, Woong Jung[†] and Younglim Kho*
Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Seongnam-si, Gyeonggi-do, 13135, Korea.
[†]*Department of Emergency Medicine, School of Medicine, KyungHee University, Seoul 05278, Korea.*
[*]*E-mail: ylkho@eulji.ac.kr*
(Received January 12, 2017; Accepted February 15, 2017)

요 약. *N*-니트로사민은 이차 아민과 아질산이 산성조건 하에서 니트로소화 반응을 통해 생성되는 니트로소 화합물이다. 약 300여 종이 존재하며, 그 중 90%가 동물실험을 통해 발암성이 있음이 확인되었다. 1987년 IARC에서 NDMA와 NDEA를 Group 2A로 지정하였고, NDPA, NDBA, NPYR, NPIP, NMOR을 Group 2B로 지정하였다. 본 연구에서는 *N*-니트로사민류의 생물학적 모니터링을 위하여 소변 중 *N*-니트로사민류의 분석법을 확립하였다. 소변시료는 고체상추출(Solid phase extraction, SPE)을 통하여 전처리 한 후, LC-(APCI)-MS/MS를 이용하여 정량분석 하였다. 확립된 분석법의 정확도는 85.8~110.2% 이었고, 정밀도는 1.1~10.5%로 나타났다. 검출한계는 0.0002 (NDBA) ~ 0.0793 (NDMA) ng/ml 이었고, 검량선 회귀식의 상관계수(r^2)은 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보여주었다. 실제 소변 중 *N*-니트로사민류의 평균 농도는 NDMA 2.645 mg/g creatinine, NDEA 0.067 mg/g creatinine, NMEA 0.009 mg/g creatinine, NDBA 0.011 mg/g creatinine, NPIP 0.271 mg/g creatinine, NPYR 0.413 mg/g creatinine 이고, NDPA와 NMOR은 검출되지 않았다. 추후 *N*-니트로사민류의 인체 노출량 평가 및 위해평가를 위한 기기분석방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

주제어: *N*-니트로사민류, 소변, 고체상 추출, LC-(APCI)-MS/MS

ABSTRACT. *N*-nitrosamines are the nitroso compounds which are produced by nitrosation reactions of the secondary amine and nitrite under acidic conditions. Approximately 300 species of *N*-nitrosamine have been tested for carcinogenicity in laboratory experiments, with 90% of them demonstrated carcinogenic effects different animal species, including higher primates. In 1978, IARC classified NDMA and NDEA as Group 2A, and NDPA, NDBA, NPIP, NPYR and NMOR as Group 2B. In this study, we established pretreatment and analytical method for *N*-nitrosamines (NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NDBA, NPIP, NPYR and NMOR) in human urine for biological monitoring of *N*-nitrosamines. The analytes were extracted using solid phase extraction (SPE), then quantitative analysis was performed by LC-(APCI)-MS/MS. The accuracies of the established method were between 85.8~108.7% and precisions were lower than 20%. The limit of detection (LOD) were between 0.0002 (NDBA) and 0.0793 (NDMA) ng/ml. The linearity obtained was satisfying for the 8 *N*-nitrosamines, with a coefficient of determination (r^2) higher than 0.999. The mean concentrations of *N*-nitrosamines in the urine were 2.645 mg/g creatinine for NDMA, 0.067 mg/g creatinine for NDEA, 0.009 mg/g creatinine for NMEA, 0.011 mg/g creatinine for NDBA, 0.271 mg/g creatinine for NPIP and 0.413 mg/g creatinine for NPYR. NDPA and NMOR were not detected. It can be used as a instrumental methodology for evaluation and risk assessment of human exposure to *N*-nitrosamines for the further research.

Keywords: *N*-Nitrosamines, Urine, Solid phase extraction, LC-(APCI)-MS/MS

1. 서 론

N-니트로사민은 이차 아민과 아질산이 산성조건 하에서 니트로소화 반응을 통해 생성되는 니트로소 화합물이다. *N*-니트로사민은 약 300여 종이 존재하며 그 중 90% 이상이 동물실험을 통해 암을 유발하는 것으로 알려져 있다.[1–3] 1954년 쥐에게서 *N*-nitrosodimethylamine(NDMA)가 첨가된 사료로 인해 간암이 발생했고,[4] 1957년 노르웨이에서 어분이 첨가된 사료를 섭취한 산양이 집단 폐사한 원인이 NDMA로 밝혀졌다.[5] 1987년 세계보건기구(World Health

Organization, WHO)산하 국제암연구소(International Agency for Research on Cancer, IARC)에서 NDMA와 *N*-nitrosodiethylamine(NDEA)를 Group 2A(인체 발암 추정, probably carcinogenic to humans)로 지정하였고, *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-nitrosodibutylamine(NDBA), *N*-nitrosopyrrolidine (NPYR), *N*-nitrosopiperidine(NPIP), *N*-nitrosomorpholine(NMOR)을 Group 2B(인체 발암 가능, possibly carcinogenic to humans)로 지정하였다.[6]

인간의 위액 내에서 *N*-니트로사민의 합성되고, 방광이나 구강 내에 세균에 의한 감염이 있을 경우에 세균이 소변이나 타액 중에 존재하는 질산염을 아질산염으로 변화시켜 결국 아질산염과 아민류가 니트로소화 반응을 통해 *N*-니트로사민을 생성할 수 있다.[7–9] NDMA는 체내에서 cytochrome p450에 의해 대사되어 친전자성 디아조늄 양이온을 형성하고, 디아조늄 양이온은 구아닌의 질소 또는 산소와 반응하여 N(7)-메틸 구아닌과 O(6)-메틸 구아닌을 생성한다. N(7)-메틸 구아닌은 돌연변이를 유발하지 않지만, O(6)-메틸 구아닌은 DNA의 돌연변이를 유발한다.[10] NDMA 치사량이 투여된 사람의 심근 및 심내막과 위장관에서 출혈이 발견되었고, NDMA가 함유된 음료수를 마시고 급성 간질환과 연관된 오심, 구토와 출혈을 보였으며, 일부는 사망에 이르렀다. NDEA 과다노출로 인해 나타나는 가능한 증상은 신경증상, 구토, 설사, 복부경련, 두통, 발열, 간 비대, 황달, 간, 신장, 폐의 기능 감소 등이 있다.[11,12]

인체시료 중 *N*-니트로사민류의 분석은 주로 소변을 통해 진행되어 왔으며, 액체상 추출(liquid liquid extraction, LLE),[13] 고체 액체 추출(Solid liquid extraction, SLE),[14,15] 고체상 추출(solid phase extraction, SPE)[16]과 같은 전처리 방법을 이용하였으며, GC-MS/MS 및 LC-MS/MS를 이용하여 정량분석 하였다.

2015년에는 햄, 소시지 등 가공육을 담배, 석면과 같은 Group 1 물질로 지정하면서 *N*-니트로사민에 대한 관심이 증가하였다.[6] 현재까지 환경, 고무제품 및 식품 중 *N*-니트로사민에 대한 모니터링과 관련 규제는 마련되어 있지만, 인체노출과 관련된 연구는 미비한 실정이다. *N*-니트로사민류의 인체노출의 45~75%는 인체 내에서 생성되는 내인성 노출에 의한 것이다.[17] 내인성 노출은 인체 내 기관에서 아민류가 아질산염 및 아질산가스 등과 니트로소화 반응을 통해 *N*-니트로사민의 생성으로 인한 노출을 의미하며,[18] 인간의 위, 방광, 구강 내에서 *N*-니트로사민류의 생성이 가능하다고 알려짐에 따라 많은 관심이 집중되고 있다.[19–21]

이에 본 연구는 *N*-니트로사민의 인체노출을 평가하기 위하여 소변 중 *N*-니트로사민의 전처리 방법과 기기분석법을 확립하고자 하였다. 본 연구를 통해 확립된 분석법의 검증을 위해 정확도, 정밀도 및 검출한계를 구하고, 실제 소변시료 중 *N*-니트로사민 노출량을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

분석 대상 물질

NDMA, NDEA, NMEA, NDPA, NDBA, NPYR, NPIP 등 *N*-니트로사민 7종은 EPA 521 nitrosamine mix(2,000 μg/ml), NMOR은 단일물질로 시그마-알드리치에서 구입하였다. 분석대상물질 8종의 분자구조식은 *Fig.* 1에 나타내었다. 내부표준물질은 NDMA-d6, NDEA-d10, NMEA-d3, NDPA-d14, NDBA-d18, NPYR-d8, NPIP-d10, NMOR-d10을 CDN isotopes(Quebec, Canada)에서 구입하였다. 아세토니트릴(acetonitrile), 디클로로메탄(dichloromethane, DCM), 헥산(hexane), 증류수는 Burdick&Jackson사(Muskegon, USA) 제품을 사용하였고, 인공 소변 제조에 사용되는 염화칼륨, 염화나트륨, 우레아, 시트르산, L-아스코르브산, 인산수소칼륨, 크레아티닌, 수산화 나트륨, 중탄산 나트륨, 황산과 고체상 추출에 사용되는 Supelclean^{TM} Coconut Charcoal SPE Tube(2 g/6 ml, Supelco)는 시그마 알드리치사(St Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

인공소변의 제조

용량플라스크(1 L)에 증류수 500 ml를 넣고 염화칼륨(≥ 99.5%) 3.8 g, 염화나트륨(≥ 99.0%) 8.5 g, 우레아(≥ 99.0%) 24.5 g, 시트르산(≥ 99.0%) 1.118 g, L-아스코르브산(≥ 98.0%) 0.382 g, 인산수소칼륨(≥ 98.0%) 1.18 g, 크레아티닌(≥ 98.0%) 1.4 g, 수산화나트륨(≥ 97.0%) 0.64 g, 중탄산나트륨(99.5~100.5%) 0.47 g, 황산(≥ 95.0%) 0.28 ml를 넣고 증류수를 표선까지

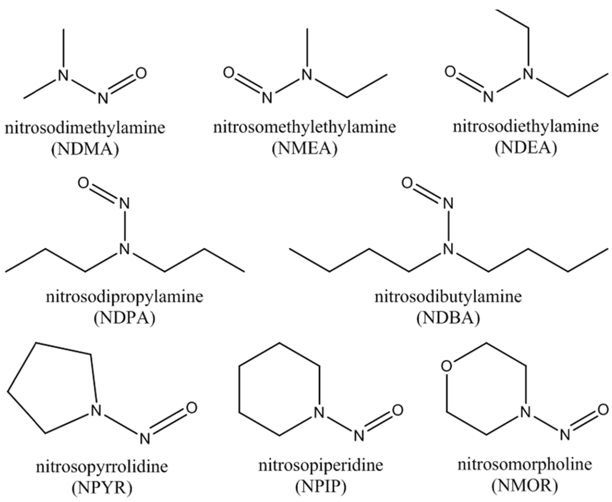

***Figure* 1.** The chemical structures of 8 *N*-nitrosamines.

가한 후 잘 혼합한다. 제조된 인공 소변은 갈색병에 담아 –20 °C 이하에서 냉동보관 후, 사용 시 해동하여 분석에 사용하였다.[22]

전처리 방법

소변 10 ml에 내부표준용액(1 μg/ml) 100 μl를 첨가하여 잘 혼합하고, Supelclean™ Coconut Charcoal SPE Tube(2 g/6 ml, Supelco)를 사용하여 고체상 추출을 실시하였다. SPE 카트리지 활성화를 위해 헥산 12 ml, 디클로로메탄 9 ml, 메탄올 6 ml, 증류수 6 ml를 통과시킨 후, 준비된 소변시료를 통과시킨다. 수분을 완전히 제거하기 위하여 진공상태에서 1시간 이상 건조시킨 후, 디클로로메탄 6 ml로 분석대상물질을 용리시킨다. 용리액에 아세토니트릴 100 μl를 첨가한 후, 진공농축기를 사용하여 100 μl까지 농축하고, 이것을 시험용액으로 하였다.

기기분석

본 연구에서 사용된 분석기기는 고성능액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography, SI-2, Shiseido, Japan)와 탠덤질량분석기(mass spectrometry, triple quad 4500 system, AB SCIEX, USA)를 사용하였다.

MS/MS를 이용한 정량분석은 APCI positive 모드로 진행하였으며, 질량분석기를 통해 얻어진 *N*-니트로사민류의 모분자(parent ion, m/z, Q1)와 딸분자(daughter ion, m/z, Q3) 및 필요한 에너지 값은 *Table* 1에 제시하였다. Curtain gas는 25 psi, Gas 1은 60 psi, NC(nebulizer current)는 3.0 kV, source temperature는 350 °C, collision gas (CAD)는 8 eV의 값을 사용하였다.

분석대상물질의 분리에 이용된 컬럼은 BEH C8 column (75 mm×4.6 mm, 3.5 μm, Waters)이다. LC-MS/MS 분석을 위한 주입량은 10 μl이며, 분리를 위한 이동상은 0.2% TFA가 함유된 물과 아세토니트릴(B)을 사용하였다. 유량은 400 μl/min이며, 경사용매조건은 다음과 같아. 0분에 이동상 B 20%로 시작하여 4분까지 이동상 B를 70% 까지 증가시키고, 1분간 유지시켰다. 그리고 8분까지 이동상 B를 90%로 증가시키고 1분간 유지한 후, 9.1분에 초기조건(이동상 B, 20%)으로 되돌린 후 6분간 유지시켰다.

분석법 검증

정확도(accuracy) 및 정밀도(precision) 평가를 위한 시료는 인공 소변 중 농도가 0.005, 0.05, 0.2, 1 ng/ml가 되도록 표준물질을 첨가하고, 농도별로 각각 5개씩 준비하였다. 준비된 시료에 내부표준물질을 첨가한 후, 본 연구에서 확립된 전처리 과정을 거쳐 정량분석 하여 일내 정확도 및 정밀도를 계산하였고. 이 과정을 3일간 반복하여 3일간 정확도 및 정밀도를 구하였다. 정확도(accuracy)는 회수율(recovery, %)을 이용하여 평가하였으며, 정밀도는 5번 반복 측정한 분석결과의 상대표준편차(RSD, %)를 이용하였다. 본 연구에서는 미국 보건복지부(US Department of Health and Human Services) 산하 FDA가 정의한 분석절차의 검증에서 규정하고 있는 검출한계의 개념을 사용하였다(FDA, 1998).[23]

***Table* 1.** Mass spectrometry parameters for the 8 N-nitrosamines and their deuterium labeled internal standards

Compounds	Q1(m/z)	Q3(m/z)	DP*	CE**	CXP***
NDMA	75.0	43.0	51	10	6
	75.0	58.1	51	15	12
NDMA-d6	81.1	46.0	51	25	8
NDEA	103.0	75.2	51	15	8
	103.0	47.2	51	23	4
NDEA-d10	113.2	81.0	46	19	6
NMEA	89.0	61.1	36	17	4
	89.0	43.1	36	17	10
NMEA-d3	92.2	64.2	11	15	6
NDBA	159.1	103.0	51	19	4
	159.1	57.2	51	15	8
NDBA-d18	117.4	66.2	61	21	4
NDPA	131.0	59.2	46	15	6
	131.0	43.1	46	23	8
NDPA-d14	145.4	50.2	51	27	8
NPIP	115.0	69.0	71	19	4
	115.0	41.2	71	31	10
NPIP-d10	125.2	78.2	36	21	6
NMOR	117.0	87.0	51	17	6
	117.0	45.1	51	31	8
NMOR-d8	125.2	95.1	61	19	6
NPYR	101.0	55.0	56	23	4
	101.0	41.1	56	37	6
NPYR-d8	109.1	62.1	130	44	7

*declustering potential
**collision energy
***collision cell exit potential

결과 및 고찰

분석법 검증 결과

본 연구에서 확립된 소변 중 *N*-니트로사민류 분석법을 통해 얻어진 *N*-니트로사민류의 크로마토그램은 *Fig.* 2에 나타내었다. 일내 정확도는 85.8~108.7%이었고, 정밀도는 20% 이하로 정밀한 값을 나타내었다(*Table* 2). 3일간 정확도는 87.2~110.2%이었고, 정밀도는 20% 이하의 값을 얻었다(*Table* 3). 검량선 회귀식의 상관계수(r^2)은 0.999 이상으로 우수한 직선성을 보여주었다. 분석대상물질의 검출

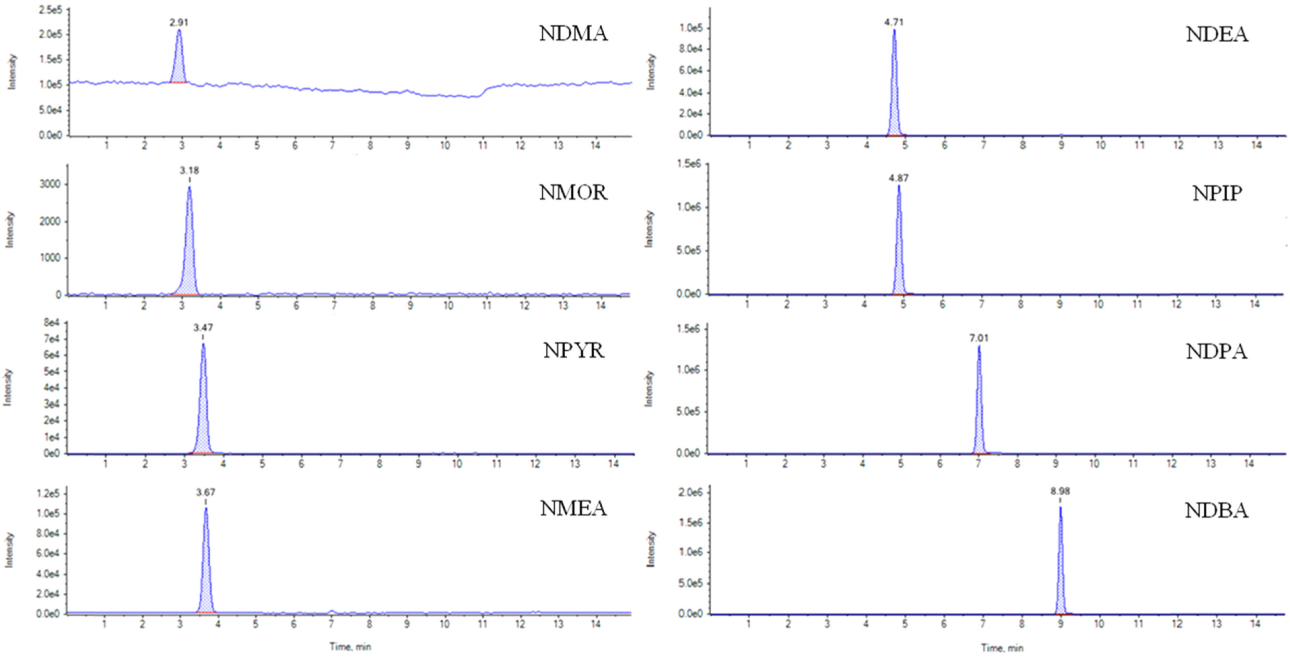

***Figure* 2.** LC-MS/MS chromatograms of *N*-nitrosamines.

***Table* 2.** Intra-day accuracies and precisions (n=5)

	Accuracies (%)				Precisions (%)			
	0.005 (ng/ml)	0.05 (ng/ml)	0.2 (ng/ml)	1 (ng/ml)	0.005 (ng/ml)	0.05 (ng/ml)	0.2 (ng/ml)	1 (ng/ml)
NDMA			108.7	106.2			5.6	3.8
NDEA	100.5	95.9	98.9	100.0	3.8	3.4	2.4	4.1
NMEA	90.6	97.1	100.2	98.7	3.8	2.2	3.8	1.5
NDBA	100.1	97.6	97.1	100.6	10.5	2.9	2.1	2.4
NDPA	85.8	97.2	98.2	101.4	6.6	2.1	1.8	1.1
NPIP	86.0	97.8	96.4	97.2	4.7	2.3	1.5	1.4
NMOR		97.6	101.6	99.2		7.6	3.0	4.5
NPYR	101.5	101.4	98.9	100.2	4.1	1.9	2.1	2.2

***Table* 3.** Inter-day accuracies and precisions (3 days)

	Accuracies (%)				Precisions (%)			
	0.005 (ng/ml)	0.05 (ng/ml)	0.2 (ng/ml)	1 (ng/ml)	0.005 (ng/ml)	0.05 (ng/ml)	0.2 (ng/ml)	1 (ng/ml)
NDMA			110.2	108.7			6.6	3.7
NDEA	100.5	102.0	100.9	102.1	3.8	9.0	2.7	5.8
NMEA	94.3	100.1	99.5	101.8	5.8	2.2	2.9	2.9
NDBA	105.7	99.6	97.9	101.1	9.5	2.0	1.7	4.1
NDPA	87.2	99.5	100.8	103.7	5.5	2.2	1.8	2.7
NPIP	88.7	97.0	98.7	100.3	10.2	2.0	1.5	2.9
NMOR		101.7	100.4	102.0		5.6	3.9	5.5
NPYR	101.5	100.3	100.9	105.8	4.1	1.8	2.5	4.0

한계는 NDMA 0.0793 ng/ml, NDEA 0.0029 ng/ml, NMEA 0.0064 ng/ml, NDBA 0.0002 ng/ml, NPIP 0.0007 ng/ml, NMOR 0.0180 ng/ml, NPYR 0.0212 ng/ml 이었다.

기존연구와의 비교

식품과 고무제품에서의 *N*-니트로사민류 분석법은 주로 GC-TEA, GC-MS, GC-MS/MS 등 이었고,[24–27] 하천수 등은 UPLC-MS/MS와 LC-MS/MS를 사용하였다.[28–30] *N*-니트로

***Table* 4.** The concentration of *N*-nitrosamines in the urine (unit: mg/g creatinie)

Compounds	Number of detected samples	Concentration (n=33)		
		Average	Minimum	Maximum
NDMA	33	2.645	0.451	7.435
NDEA	32	0.067	ND	0.151
NMEA	11	0.009	ND	0.058
NDBA	33	0.011	0.002	0.047
NDPA	0	-	-	-
NPIP	33	0.271	0.009	3.641
NMOR	0	-	-	-
NPYR	33	0.413	0.026	4.079

사민류는 수용성이 크며, 소변시료의 특성상 LC를 이용한 분석이 유리하므로 본 연구에서는 LC-MS/MS를 이용하여 분석법을 확립하였다. 소변시료의 전처리는 주로 액체상 추출(LLE),[13] 고체 액체 추출(SLE),[14,15] 고체상 추출(SPE)[16]을 통해 이루어 졌다. 본 연구에서 전처리 방법을 비교하여 표준물질과 내부표준물질의 회수율이 100%에 근접한 고체상 추출 방법을 택하였다.

선행연구에서의 검출한계는 NDMA(0.0026~0.0133 ng/mL), NDEA(0.0026~0.0133 ng/mL), NMEA(0.0020~0.0080 ng/mL), NMEA(0.0020~0.0080 ng/mL), NDBA(0.0047 ng/mL), NPIP (0.0007~0.0051 ng/mL), NMOR(0.0030~0.0078 ng/mL), NPIP (0.0082~0.0267 ng/mL)의 값을 보였으며,[13,15,16] 본연구에서 얻어진 검출한계와 비교하였을 때 NDEA. NMEA, NDBA, NDPA, NPIP, NPYR은 선행연구에서 제시한 검출한계 범위에 속하였으며, NDMA와 NMOR은 선행연구들 보다 검출한계가 높았다. 하지만 본 연구에서 실제 소변시료를 분석한 결과와 선행연구에서의 분석결과에서 NDMA는 대부분의 시료에서 검출되었고, NMOR는 대부분의 시료에서 검출되지 않았으므로[31,32] 실제 소변시료 분석에는 문제가 없는 것으로 판단된다.

소변 중 *N*-니트로사민류 분석결과

대상자 33명에 대한 소변 중 *N*-니트로사민의 평균 농도(최소~최대농도)는 NDMA 2.645(0.451~7.435) mg/g creatinine, NDEA 0.067(ND~0.151) mg/g creatinine, NMEA 0.009 (ND~0.058) mg/g creatinine, NDBA 0.011(0.002~0.047) mg/g creatinine, NPIP 0.271(0.009~3.641) mg/g creatinine, NPYR 0.413(0.026~4.079) mg/g creatinine 이고, NDPA와 NMOR은 검출되지 않았다(*Table* 4).

본 연구의 결과를 이전 연구결과와 비교하면 NDMA는 대부분의 시료에서 모두 검출되는 양상을 보인다. Seyler TH *et al*.(2013)[15]과 Hua CW *et al*.(2016)[16]의 연구에서는 비흡연자와 흡연자의 소변 중 *N*-니트로사민류의 농도를 비교하였을 때, NDMA, NMEA, NDEA, NPIP, NPYR의 농도가 흡연자의 소변에서 근소하게 높게 나타났으나 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 또한, 본 연구에서는 NDPA와 NMOR이 검출되지 않았지만 Hua CW *et al*.(2016)[15]의 연구에서는 흡연자에서는 검출되지 않았고, 비흡연자와 UTI(urinary tract infection, 요로감염증) 환자에게서 30% 이상의 시료에서 검출되었다. 이와 같은 것으로 미루어 볼 때 *N*-니트로사민류의 인체노출은 *N*-니트로사민 생성가능물질의 섭취 및 세균감염 등과 같이 복합적인 요인을 통해 노출되는 것으로 생각된다.

결 론

본 연구는 소변 중 *N*-니트로사민류를 추출해내는 전처리법과 각 물질을 분리하기 위한 최적의 LC-MS/MS 시스템의 조건을 확립하였다. 또한, 확립된 분석법의 검증 결과 우수한 직선성과 분석에 적합한 정확도, 정밀도 및 검출한계를 보였으며, 실제 소변 중 *N*-니트로사민류 분석을 통해 분석법의 적용성을 검토하였다. 그 결과, 추후 *N*-니트로사민류의 인체 노출량 평가 및 위해평가를 위한 기기분석방법으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

REFERENCES

1. Xu, L.; Qu, Y. H.; Chu, X. D.; Wang, R.; Nelson, H. H.; Gao, Y.T. *PLpS ONE* **2015**, *10*, e0117326.
2. Preussmann, R. *IARC Sci. Publ.* **1983**, *45*, 3.
3. Sung, N. J.; Lee, S. J.; Shin, J. H.; Kim, J. G. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **1997**, *26*, 614.
4. Magee, P. N.; Barnes, J. M. *Brit. J. Cancer* **1956**, *10*, 114.
5. Ender, F.; Havre, G.; Helgebostad, A.; Koppang, N.; Madsen, R.; Ceh, L. *Naturwissenschaften* **1964**, *51*, 638.
6. International Agenecy for Research on Cancer (IARC) *IARC Sci. Publ.* **2010**, *94*, 43.
7. Stickler, D. J.; Chawla, J. C.; Tricker, A. R.; Preussmann, R. *International Medical Society of Paraplegia* **1992**, *30*, 855.

8. Lee, S. H.; Choi, Y. H. *Journal of Life Science* **2013**, *23*, 602.
9. Shamsuddin, A. S.; Ismail, S. N. S.; Sham, S. M.; Abidin, E. Z. *International Journal of Sciences* **2014**, *15*, 176.
10. Brown, T.; Brown, T. Jr. In *Nucleic Acids Book*; Brown, T., Ed; Nucleic Acids Book: United Kingdom, **2013**, Available from: http://www.atdbio.com/nucleic-acids-book.
11. Kimbrough, R. D. In *Nitrosamines and Human Cancer*; Magee, P. N., Ed.; Cold Spring Harbor: New York, U.S.A. 1979; Vol. 12, p 25.
12. The National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) In *NIOSH pocket guide to Chemical Hazards*; *Ed.*; DHHS (NIOSH) Publication: Washington DC, U.S.A. 2007; p 2005.
13. Hodgson, J. A.; Seyler, T. H.; McGahee, E.; Arnstein, S.; Wang, L. *American Journal of Analytical Chemistry* **2016**, *7*, 165.
14. Akyüza, M.; Ata, S.; Dinç, E. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2016**, *117*, 26.
15. Seyler, T. H.; Kim, J. G.; Hodgson, J. A.; Cowan, E. A.; Blount, B. C.; Wang, L. *Journal of Analytical Toxicology* **2013**, *37*, 195.
16. Hu, C. W.; Shih, Y. M.; Liu, H. H.; Chiang, Y. C.; Chen, C. M.; Chao, M. R. *Journal of Hazardous Materials* **2016**, *310*, 207.
17. Nair, J.; Ohshima, H.; Friesen, M.; Croisy, A.; Bhide, S. V.; Bartsch, H. *Carcinogenesis* **1985**, *6*, 295.
18. Jo, C. H.; Park H. R.; Kim, D. S.; Lee, K. H.; Kim, M. *Korean Journal of Food Science and Technology* **2010**, *42*, 541.
19. Stickler, D. J.; Chawla, J. C.; Tricker, A. R.; Preussmann, R. *International Medical Society of Paraplegia* **1992**, *30*, 855.
20. Lee, S. H.; Choi, Y. H. *Journal of Life Science* **2013**, *23*, 602.
21. Shamsuddin, A. S.; Ismail, S. N. S.; Sham, S. M.; Abidin, E. Z. *International Journal of Sciences* **2014**, *15*, 176.
22. Lee, S. Y.; Son, E. J.; Kang, J. Y.; Lee, H. S.; Shin, M. K.; Nam, H. S.; Kim, S. Y.; Jang, Y. M.; Rhee, G. S. *Bulletin of the Korean Chemical Society* **2013**, *34*, 1131.
23. Food and drug administration (FDA) In *guidance for industry*; Ed.; FDA Publication:Washington, D.C. **1998**.
24. Mutsuga, M.; Yamaguchi, M.; Kawamura, Y. *American Journal of Analytical Chemistry* **2013**, *4*, 277.
25. Feng, D.; Zhou, Q.; Cheng, X.; Wang, J.; Yang, Q. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **2010**, *84*, 373.
26. Feng, D.; Liu, L.; Zhao, L.; Zhou, A.; Tan, T. *Journal of Chromatographic Science* **2012**, *50*, 733.
27. Incavo, J. A.; Schafer, M. A. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *557*, 256.
28. Kodamatani, H.; Yamazaki, S.; Saito, K.; Karikart, A. A.; Kishikawa, N.; Kuroda, N. *Journal of Chromatography A* **2009**, *1216*, 92.
29. Plumlee, M. H.; Mesas, M. L.; Heidlberger, A.; Ishidac, K. P.; Reinhard, M. *Water research* **2008**, *42*, 347.
30. Venkatesan, A. K.; Pycke, B. F. G.; Halden, R. U. *Environmental Science &Technology* **2014**, *48*, 5085.
31. Vermeer, I. T. M.; Engels, L. G. J. B.; Pachen, D. M. F. A.; Dallinga, J. W.; Kleinjans, J. C. S.; Maanen, J. M. S. A. *Gastroenterology* **2001**, *121*, 517.
32. Mohsen, M. A. A.; Hassan, A. A. M.; Sewedy, S. M. E.; Azm, T. A.; Magagnotti, C.; Fanelli, R. *International Journal of Cancer* **1999**, *82*, 789.