
碩 士 學 位 論 文

자리젓中 N-nitrosamine 에 關한 研究

Studies on N-nitrosamine in the Salt-Fermented
Damsel fish, *Chromis notatus*.



濟州大學校大學院

食 品 工 學 科

康 淳 拜

1984年 12月 日

認 准 書

碩 士 學 位 論 文

자리젓中 N-nitrosamine 에 關한 研究

Studies on N-nitrosamine in salt-fermented damsel fish,
Chromis notatus

指 導 教 授 金 洙 賢

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

1984年 12月 日



食 品 工 學 科

康 淳 拜

위 工學碩士學位 論文을 認准함.

1984年 12月 日

委 員 長 :

委 員 :

委 員 :

目 次

Summary	3
I. 緒 論	5
II. 研 究 史	8
1. N-nitrosamine 의 發癌性 및 加工中에서의 生成	8
2. 最近의 研究動向	9
3. 分析方法의 發展	10
4. 國內의 研究動向	11
III. 材 料 및 方 法	13
1. 試料 및 調製	13
2. 官能檢査에 의한 熟成度 判定	13
3. 水分, 鹽分 및 pH의 測定	13
4. 窒酸鹽窒素 및 亞窒酸鹽窒素의 定量	13
5. TMAO 및 TMA의 定量	19
6. DMA의 定量	21
7. N-nitrosamine 의 定量	23
8. 酸性條件에서 Nitroso 化한 試料에서 N-nitrosamine 의 定量 및 同定	24
IV. 結 果 및 考 察	27
1. 官能檢査 結果	27
2. 水分 및 鹽分含量	27

3. 熟成에 따른 pH의 變化	28
4. 窒酸鹽窒素 및 亞窒酸鹽窒素의 含量變化.....	29
5. TMAO 및 TMA의 含量變化	30
6. DMA의 變化	32
7. N-nitrosamine 定量	33
8. 酸性 條件에서 亞窒酸나트륨 添加한 試料에서의 N-nitrosamine 含量	33
9. 食品으로서 자리젓과 N-nitrosamine의 生成 可能性	38
摘 要	41
參 考 文 獻	44



Summary

N-Nitrosamines have been known to be strong carcinogens and are formed by the reaction of nitrous acid with amines.

In this experiment, the changes of nitrite, nitrate, trimethylamineoxide (TMAO), trimethylamine (TMA) and dimethylamine (DMA) during fermentation of damsel fish were analyzed periodically and N-nitrosamines in a commercial products.

It was carried out to determine N-nitrosamine by mineral oil distillation methods using gas chromatography-thermal energy analyzer (GC-TEA) and nitrite and amines by colorimetric methods.

Levels of nitrate-N were gradually decreased, but nitrite-N was not detected or trace.

Contents of dimethylamine (DMA) and trimethylamine were markedly increased, while trimethylamineoxide nitrogen was decreased during the fermentation of damsel fish.

N-Nitrosamines were not detected in salt-fermented damsel fish, but much N-nitrosodimethylamine (NDMA) could be detected in salt-fermented damsel fish after adding 0.05 M·NaNO₂ in the acidic condition. The identification of NDMA in it was confirmed by mass spectrophotometry.

Nitrate decreased during the fermentation of damsel fish. However, nitrosamines were not formed and nitrite was trace level in it.

This could be explained that it was due to the rapid consumption of nitrite by amino acid and bacteria.

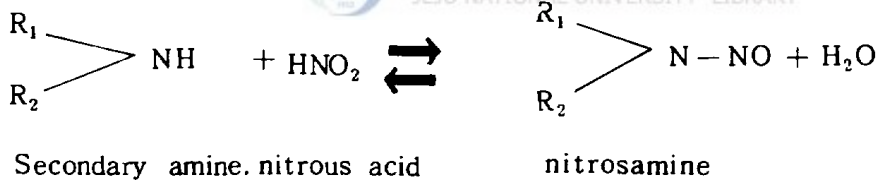


I. 緒 論

食品工業의 發展과 더불어 우리의 食生活은 그 質的으로 進步되고 簡便해 지고 있으나, 食品으로 因한 各種 危害物質과 公害要因등은 人類 保健에 惡影響을 미치는 問題點으로 提起되어지고 있다.

近來 人類 保健에서 가장 큰 關心事中的의 하나는 癌誘發 物質이며 特히 注目을 받는 物質中的의 하나가 nitrosamine 이다.

強力한 癌原性 및 突然變異性을 지닌 nitrosamine 은 亞窒酸과 아민類와의 反應에 의하여 다음 反應式과 같이 生成하는데, 近來에 와서 食品中에서 그 存在가 注目되고 있다 (Ender 등. 1964 ; Cross 등. 1978.; Edward 등. 1972 ; Fiddler 등. 1971 ; Theiler 등. 1981 a. b).



N-Nitrosamines이 特別히 注目을 받는 理由는 ppm(mg/kg)水準의 낮은 濃度로서도 人體에 癌을 일으킬 수 있기 때문이며 環境的으로 容易하게 生成되거나, 그의 前驅物質을 含有한 食品을 攝取했을때 人間의 胃液 酸性條件에서 生成되어 癌을 誘發할 可能性이 있기 때문이다 (Magee. 1971; Ronald 등. 1977).

N-Nitrosamines은 우리가 每日먹고 있는 野菜類中的의 亞窒酸鹽과 肉類나 魚類中的의 아민類가 反應하여 N-nitrosamine이 生成될 可能性이 있다는 데 더욱

關心이 있다 (Kim 등, 1984 a).

Mirvish(1970)는 dimethylamine 과 亞窒酸鹽이 反應하여 NDMA이 生成함을 보았고 그 最適 pH는 3.4 임을 밝혔다. 또한 NDMA의 生成速度는 DMA 濃도에 比例하고 亞窒酸鹽濃도의 제곱에 比例한다는 事實을 報告하였다. N-Nitrosamines 은 一般的으로 二級 아민이 그 生成 母體가 된다고 생각하여 왔었는데 最近의 研究에 의하여 第三級 아민, 第四級 암모니움 化合物에서도 nitrosamine 이 生成된다는 事實이 밝혀지게 되었다 (Scanlan, 1975).

海産魚類에는 TMAO가 많이 含有되어 있고, 이것이 加工, 貯藏中 TMA를 거쳐 DMA로 變化한다는 報告가 있다 (Kawabata 등, 1953; Kawabata 와 Oshima, 1978; Tokunaga, 1980).

Margurdt 등 (1976)에 의하면 正常인의 胃液은 pH가 1-4이며 唾液中에 亞窒酸鹽이 濃縮되어 있어 食品中の 아민類와 反應하여 nitrosamine 生成 가능성이 높다고 報告하였다. 美國인의 唾液中에는 6-10 mg/kg (Tannenbaum 등, 1978)의, 日本人의 경우 15-20 mg/kg (Ishiwata 등, 1975)의 亞窒酸鹽이 含有되어 있다고 報告하였다.

Ko(1979)는 韓國인 150名을 對象으로 食事後 唾液中의 亞窒酸 生成 가능성을 調査한 結果 20 mg/kg 이상임을 報告하였다.

Yim 등 (1973)은 젓갈류에서 0.66 ~ 1.44 mg/kg의 亞窒酸鹽이, Moon 등 (1973)은 젓갈류에서 4.2 ~ 17.2 mg/kg의 窒酸鹽이, 명란젓 2個中 1個가 0.08 mg/kg의 亞窒酸鹽이 檢出되었음을 報告하였다. Kim 등 (1984)은 김치 熟成中 nitrosamine의 定量과 그 前驅物質을 測定한 結果, 새우젓 添加한 試料에서 0.2 mg/kg이 檢出됨을 보았고 다른 試料는 檢出限界 未滿으로 報告하였으며

DMA 含量은 멸치젓 添加 試料에서 70 日째 44 mg/kg으로 報告하였다.

이와 같이 鹽藏 및 醱酵食品中 nitrosamine 의 前驅物質인 窒酸鹽, 亞窒酸鹽, 그리고 아민類의 含量에 대해서는 여러 種類에서 調査되어 졌으나 자리젓에 대해서는 아직껏 研究된 바 없다.

우리 古來의 傳統 醱酵食品인 자리(damsel fish, *Chromis notatus*)젓은 그 獨特한 風味로 因하여 자리회와 함께 濟州地方의 鄉土 固有 食品으로 愛用되고 있다.

이에 本 研究는 자리젓을 담그어, 이를 試料로 14 日로 週期로 nitrosamine 의 前驅物質인 窒酸鹽, 亞窒酸鹽, TMAO, TMA 그리고 DMA 含量을 測定하였다.

또 市販 자리젓을 試料로 nitrosamine 의 前驅物質들을 같은 方法으로 測定하여 比較하는 한편 GC-TEA를 利用하여 N-nitrosamine 을 定量하였고, 胃液 酸性條件에서 亞窒酸나트륨을 添加하여 生成을 確認하고 N-nitrosamine 의 生成 可能性을 綜合 檢討하였다.

II. 研 究 史

1. N-nitrosamine의 發癌性 및 食品加工 中에서의 生成

Magee 와 Barnes(1954)는 NDMA를 흰쥐에 投與한 結果 심한 肝臟炎이 생겼다고 報告하였고, 2年後 같은 調査者들은 쥐들이 NDMA를 攝取함으로 因하여 肝癌이 생겼다고 報告하였다. 그 以後 많은 研究者들이 N-nitroso 化合物에 대해 研究하기 始作하였고, 그 中에는 突然變異性 및 畸形的 形質을 갖고 있어서 動物에 投與하였을 때 그 子孫에게 종양이 생길 수도 있다고 하였다 (Scalan. 1975).

人間이 먹는 食品中에서도 이러한 化合物이 生成될 수도 있다는 事實은 1957年 노르웨이에서 發生한 밍크, 산양, 소등의 大規模 中毒事件에서 나타났다.

그 事件은 家畜飼料인 청어 魚粉을 製造할 때 保存料로 亞窒酸나트륨 (NaNO_2)을 添加하여 製造된 것을 家畜에게 먹었을 때 급성 肝臟害를 일으켜 集團적으로 죽은 事件이다. 그 以後 Ender 등(1964)에 의해서 中毒을 일으킨 原因이 NDMA 生成에 있었다는 事實이 밝혀지게 되었다. 이를 계기로 nitrosamine의 食品衛生上 커다란 問題로 대두되기 始作하였고 이에 關한 研究가 활발하게 進行되고 있다.

Mirvish(1970)는 放射線 同位元素로 標識시킨 amine을 利用한 實驗에서 亞窒酸과 反應하여 NDMA가 生成함을 確認하였고 그 生成 最適 pH는 3.4이며, 生成速度는 亞窒酸의 제공에 比例하고 amine의 곱에 比例한다는 事實을 確認하였다.

Sakai 와 Tanimura(1971 b)는 돼지 胃 內容物을 抽出, 生體內 NDMA 生成 實驗을 한 結果, 이들 前驅物質 投與量의 增加에 따라 生成率이 增加함을 確認하였다. Sen 등(1982)은 bacon, sausage 및 ham 製造時 添加되는 亞硝酸鹽이 이들을 調理할 때 N-nitrosamine 에 關하여 報告한 바 있으며 人間이 攝取하는 野菜類(Phillips 등. 1968; Kim 등. 1984 a ; Moon 등. 1973; Yim 등. 1973) 및 魚類中(Fiddler 등. 1971; Ito 등. 1976; Kim 등. 1984 b ; Park 등. 1981; Singer 등. 1976)에 發癌性 N-nitrosamine 을 生成할 수 있는 前驅物質이 많이 含有되어져 있음이 알려지게 되었다.

Hildrum 등(1976)은 食鹽 添加量이 nitrosamine 生成에 密接한 關係가 있다는 데 關心을 갖고 調査한 結果, pH 2.0 以下에서는 生成 促進, 그 以上에서는 生成을 抑制한다는 事實을 밝혔다.



2. 最近의 研究動向

食品加工, 貯藏 및 調理中 nitrosamine 이 生成될 可能性이 많아 WHO와 食品學者들은 이를 發癌物質로 規定, 계속적 研究를 推究하고 있다(Bassir 등. 1978; Cross 등. 1978; Edward . 1972; Fan 등. 1978; Fazio 등. 1971; Fiddler 등. 1971; James 등. 1978; Havery 등. 1978; Hotchkiss 등. 1978; Margurdt 등. 1976; Scanlan. 1975).

그러나 微量의 N-nitrosamine 은 特殊 微量分析裝置가 없이는 人體內 癌 發生 機作을 具體적으로 究明할 수 없는 立場에 있다.

WHO는 이를 重要視하여 IARC(International Agency for Research on cancer, Lyons, France)를 通하여 N-nitrosamine 에 對한 國際 심포지움을 2

年마다 開催하여 이 分野의 專門 科學者들, 간의 研究結果를 討論하고 새로운 研究方向을 모색하고 있다. 歐美先進國에서는 發癌性 nitrosamine의 生成 抑制方法을 研究하고 있으며 ascorbic acid, α -tocopherol, ascorbyl - palmitate 등이 N-nitrosamine의 生成防止에 効果的임이 알려지고 있다 (Fiddler 등, 1978; Scanlan, 1975; Theiler 등, 1981 a).

3. 分析方法의 發展

N-nitrosamine에 對한 關心이 높아짐에 따라 보다 正確하고 正密하게 分析하기 위한 研究도 활발하다.

Hirayama 등(1978)에 의하면 nitrosamine 分析은 Thin Layer Chromatograph(TLC)法, Gas Liquid Chromatograph(GLC)法, Gas Chromatograph - mass spectrophotometry(GC-MS)法, Thermal Energy Analyzer(TEA)를 GC 및 HPLC에 附着하는 GC-TEA 및 LC-TEA法이 있음을 報告했다.

TLC法은 檢出感도가 떨어질 뿐만 아니라 妨害成分의 影響을 받기 쉬우며, GLC法은 檢出器에 따라 FID(Flame Ionization Detector)에서는 選擇성이 없고 檢出感도가 떨어지며, ECD(Electronic Capture Detector)로는 直接檢出이 不可能하여 酸化시킨 다음 nitrosamine으로 分析하는데 再現성이 나쁘며 nitrosamine 分析에의 應用은 어렵다고 報告하였다. GC-MS法은 GC로 測定하고 MS로 確認하는 것으로 가장 確實한 方法이긴 하나 感도가 높지 못하여 數십~100 mg/kg 程度의 nitrosamine이 아니면 確認이 어렵다.

1975年 Fine과 Rounbehler는 TEA法을 開發하였는데, 이것은 nitrosamine에 對하여 가장 特異성이 높고 感도가 좋아 特別히 nitrosamine 分析을

위해 考案된 檢出器이다. 다시 Fine 등(1975)은 TEA를 GC에 附着하여 利用하는 mineral oil distillation 法을 開發하였다. 그 檢出器는 $\mu g/kg$ 程 度의 낮은 濃度일지라도 測定할 수 있었으나 MS에 의한 證明은 할 수가 없었다.

Havery 등(1978)은 TEA의 正確性和 感度を 測定하기 위하여 multi de- tector GC-MS 法과 mineral oil distillation-TEA 法에 의한 두가지 方法을 比較하고 ppb($\mu g/kg$) 水準의 nitrosamine 까지도 測定할 수 있음을 報告하 였으며 James 등(1980), Theiler 등(1981 a, b)에 의해 再 確認되었다.

4. 國內의 研究動向

N-nitrosamine 이 食品衛生上 世界的 關心事로 登場함에 따라 우리나라에 서도 N-nitrosamine 에 對한 關心이 높아지고 주로 前驅物質에 對한 報告 가 되어지고 있다.

Yim 등(1973)은 食品中の 二級 아민과 亞窒酸鹽의 分布를 調査하여 sau- sage 에서 $3.56 \sim 18.70 mg/kg$ 의 亞窒酸鹽을 檢出하였고, 명란젓에서 最高 $21.8 mg/kg$ 의 DMA 를 檢出하였다. Moon 등(1973)은 食品中 窒酸鹽, 亞窒酸鹽 및 아민류의 含量을 3年間 5회에 걸쳐 發表한 바, 젓갈에서 窒酸鹽 $4.2 \sim 17.2 mg/kg$ 이, DMA 含量은 홍합에서 $2.97 \sim 4.08 mg/kg$, 생선묵에서 $3.64 \sim 6.08 mg/kg$ 으로 報告하였다. Chung 과 Lee(1976)은 20% 食鹽 添加한 새 우젓에서 $878 mg/kg$ 의 TMA가, $1,945 mg/kg$ 의 TMAO가 檢出됨을 報告하였 다. Pyun 등(1976)은 熟成된 멸치젓에서 $100 mg/kg$ 의 TMA가, DMA의 量은 最高 $146.5 mg/kg$ 이 檢出되고 TMAO는 檢出되지 않음을 報告하였다.

Kim 등(1984 a)은 GC-TEA를 이용하여 젓갈類의 添加에 따른 김치 熟成
中 N-nitrosamine을 定量하고 그의 前驅物質의 變化를 檢討 報告하였으며
Sung 등(1984)은 굴비 製造中 nitrosamine의 前驅物質을 定量하여 nitros-
amine의 生成要因을 檢討한 바 있다.

Ⅲ. 材 料 및 方 法

1. 試料의 調製

1983年 4月 22日 城山邑 新陽理 앞바다에서 어획한 자리돔을 즉시 研究室로 運送, 20% 食鹽을 添加하여 1ℓ 容器 7個에 各各 넣어 자리돔을 담그어 常溫 暗所에 貯藏, 熟成시키면서 試料로 사용하였다. 한편 대정읍 하모리에서 製造된 市販 자리돔을 濟州 국제공항에서 구입하여 上記의 試料와 같은 實驗項目을 設定하여 實驗하였다. 또 이 市販 자리돔을 試料로 N-nitrosamine을 定量하였다.

2. 官能檢査에 의한 熟成度 判定

熟成期間中 研究室員 5名으로 panel member를 構成하고 官能檢査를 實施하여 熟成程度를 判定하였다.

3. 水分, 鹽分, pH의 測定

水分은 常壓加然乾燥法, 鹽分은 鹽度計 (Atago salt meter)로, pH는 pH meter (chemtrix Type 40)를 使用하여 測定하였다.

4. 窒酸鹽窒素 및 亞窒酸鹽窒素의 定量

Len kamm등 (1965)의 方法에 따라 比色計 (Spectronic 21 Model UV-M)를 使用하여 定量하였다.

가. Cadmium column 製造

20% CdSO₄ 溶液 500 ml 에 봉상아연을 넣어 3~4 時間 放置하여 생긴 봉상아연 수위의 Cadmium을 핀셋으로 떼내어 물로 5회 세척하여 이것을 물과 함께 blending 하여 20~40 mesh 정도의 Cadmium 粒子로 만들어 Cadmium column 에 충전하였다. 즉 Fig. 1 과 같은 column 에 증류수를 넣은후 glass wool 을 1 cm 정도 채우고 다음에 粉粒狀 백색모래와 Cadmium 粒子로 1 cm와 7 cm의 높이로 충전시켰다. 한편, 實驗에 使用한 칼럼은 0.1N-HCl 25 ml 를 통과시킨 후 10 배로 희석한 buffer 溶液 25 ml 로 세척하여 再 使用하였다.

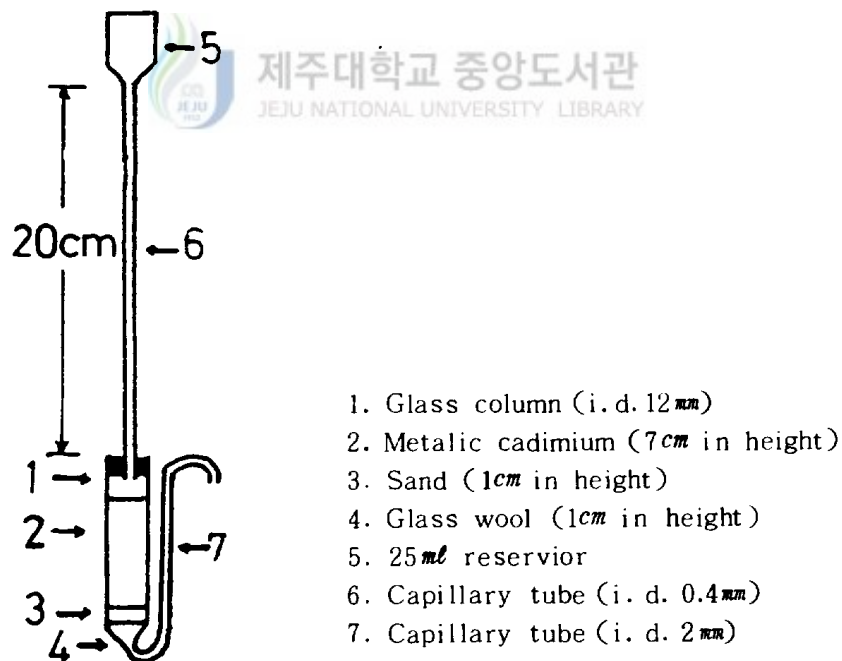


Fig. 1. Cadmium column for reduction of nitrate to nitrite

나. 標準檢量曲線

窒酸鹽窒素 標準檢量曲線 : 特級 NaNO_3 (和光純藥) 0.6068 g 을 물로써 1 l 로 하여 이것은 1, 2, 3, 4, 5, 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 濃度로 試液을 調製한 후 그 중 5 ml 取하여 Cd column 에 통과시켜 窒酸鹽을 亞窒酸鹽으로 환원시켜 이 檢液을 亞窒酸鹽窒素의 定量方法에 따라 檢量線을 作成하였다 (Fig. 2).

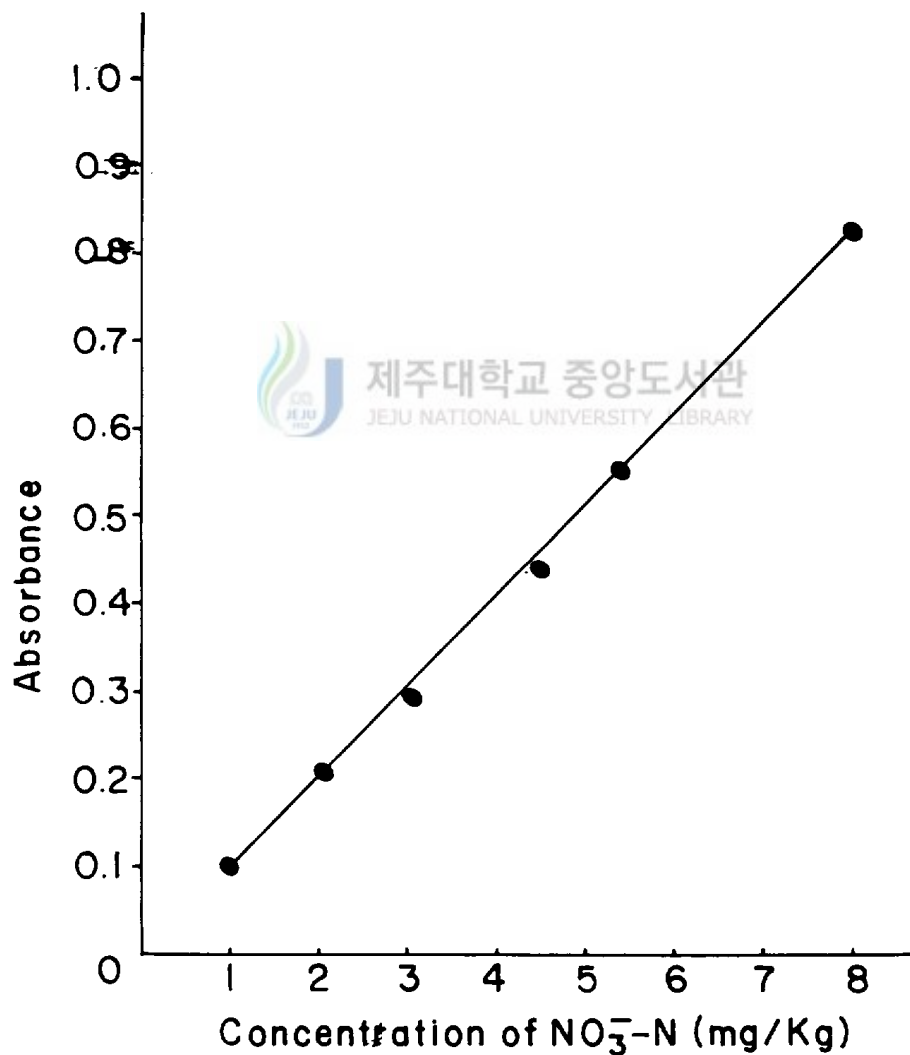


Fig.2. Calibration curves for NO_3^- -N.

亞硝酸鹽窒素의 標準檢量曲線 : 特級 NaNO_2 (和光純藥) 0.4925 g 을 取하여 buffer 溶液 5 ml 를 加하고 증류수로 1 l 로 한다음 一定量씩 取하여 증류수로 100 ml 로 한 후 各 溶液에 buffer 溶液 5 ml 와 1-naphthylamine 溶液 2 ml 를 넣은 暗所에서 2 時間 동안 放置한 후 檢量曲線을 作成하였다 (Fig. 3).

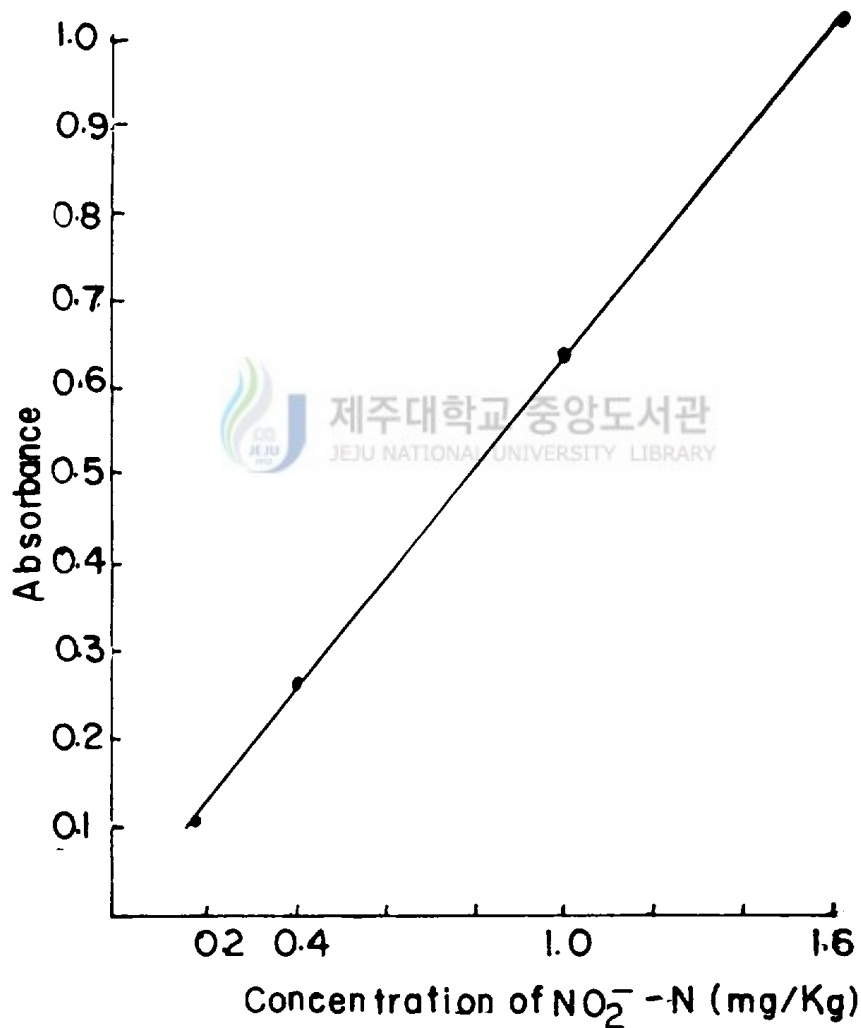


Fig. 3. Calibration curves for $\text{NO}_2^- \text{-N}$.

다. 窒酸鹽窒素의 定量

試料 자리짓 10 g을 取해 buffer 溶液 5 ml, Alumina cream 50 ml 및 증류수 50 ml를 加하고 Homogenizer 로 均質化한 후 증류수로 200 ml로 하고 whatman No. 41 여지로 여과하여 여액중 20 ml를 取하여 여기에 buffer 溶液 5 ml를 加하여 환원칼럼에 통과시켜 아질산염으로 환원시켰다. 이 여액에 1-naphthylamine 溶液 2 ml를 加하여 冷暗所에서 2時間 放置시킨 후 분액깔대기를 옮겨 Chloroform으로 4회 추출하고 여기에 Methanol-HCl 溶液 10 ml를 加한 후 Chloroform으로 50 ml로 하여 560 nm에서 吸光度를 測定하였다.

라. 亞窒酸鹽窒素의 定量

Fig. 4와 같은 方法으로 처리된 여액 20 ml를 取해 이에 buffer 溶液 5 ml와 1-naphthylamine 溶液 2 ml를 加한 후 증류수로서 100 ml로 하여 冷暗所에서 2時間 放置한 후 窒酸鹽窒素의 定量과 같은 方法으로 定量하였다.

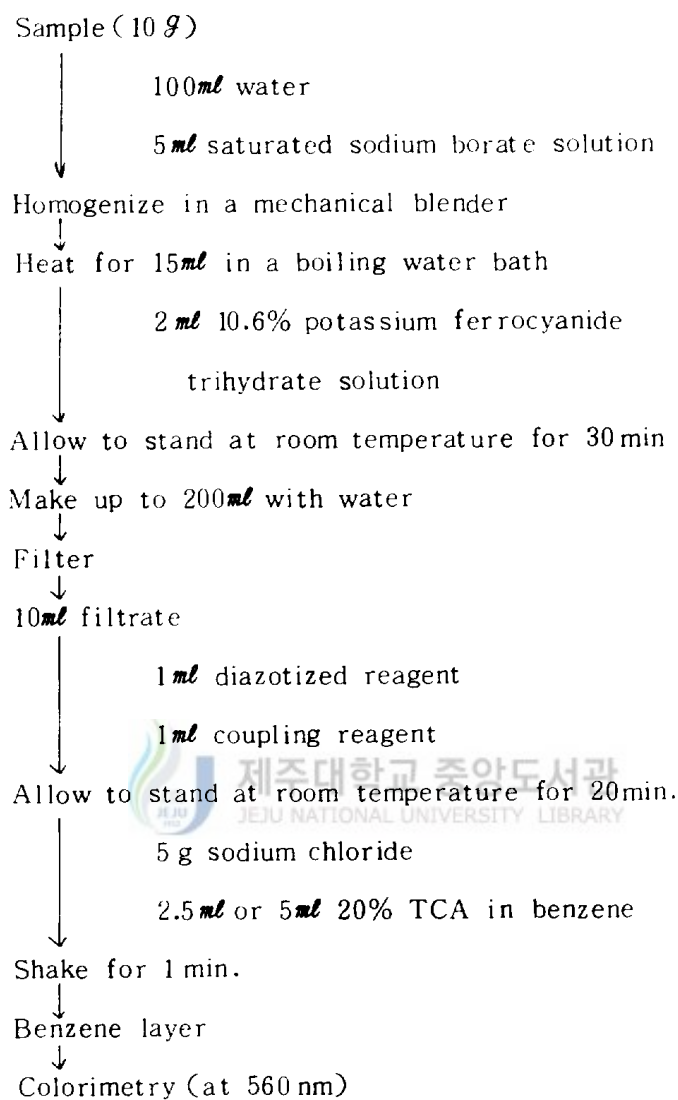


Fig.4. Procedures for colorimetric determination of nitrite.

5. TMAO 및 TMA의 定量

Dyer 法(1945)을 改良한 Hashimoto 와 Okaichi(1957)의 方法에 따라 定 量하였다. 즉, TMA는 4% 三鹽化아세트산 溶液으로써 抽出한 試料 溶液 5 ml를 20 ml들이 마개있는 試驗管에 넣고 10% 포르말린 1 ml를 加하여 混合하고 이어서 10 ml의 脫水톨루엔을 넣은후 25% KOH 2 ml를 加하여 混合하고 30℃에서 10分間 放置시킨 다음 1分間 세게 흔들었다.

室溫에서 5分 以上 정치시킨 후, 上層의 톨루엔層만을 미리 0.5g의 無 水 황산나트륨을 넣은 마개있는 試驗管에 옮기어 가볍게 흔들었다. 이 脫 水 溶液을 0.02% 피크린酸·톨루엔 溶液과 混合하여, 410 nm에서 無水톨 루엔을 對照液으로 하여 吸光度를 測定하였다.

對照試驗은 抽出液대신 TMA의 4% 三鹽化아세트산 5 ml로써 같은 操作 을 하여 作成하였다 (Fig. 5).

TMAO은 三鹽化아세트산 抽出液 2 ml를 試驗管에 取하고, 1% $TiCl_3$ 溶 液 1 ml를 加한 다음 마개를 하고, 80℃에서 15分間 還元시킨 후 흐르는 물에서 冷却하고 위와 같은 方法에 따라 TMA을 定量하였다. 그리하여 還元후의 TMA 量에서 還元前의 TMA 量을 빼어 TMAO 量을 算出하였다.

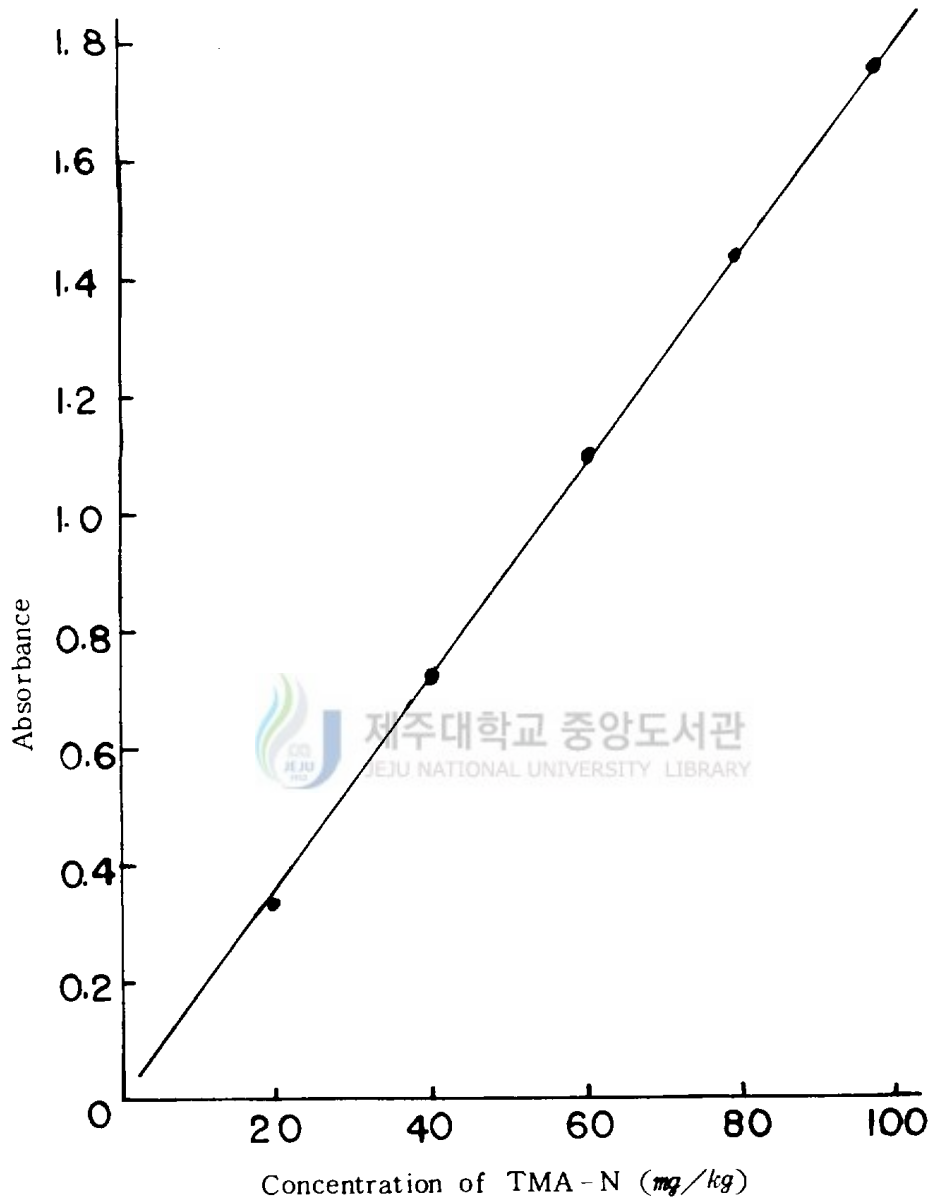


Fig. 5. Calibration curve for trimethylamine-N (at 410 nm)

6. DMA의 定量

河端와 石橋(1974)에 의한 改良 Cu-dithiocarbamate에 의한 比色定量法에 따라 定量하였다. 즉, 試料 約 10 g을 100 ml들이 定容플라스크에 증류수 75 ml와 함께 넣은 후 잘 흔들고 15分間 放置한 다음 20% 三鹽化아세트酸溶液 10 ml를 添加하고 증류수로서 100 ml로 한 후 잘 흔들다음 15分間 放置한 것을 東洋濾紙 No. 5 A로 濾過하여 被檢液으로 使用하였다.

이와같이 하여 抽出한 溶液 5 ml를 50 ml들이 分液갈대기에 取한 후 CS₂ CHCl₃ 混液(5% CS₂ in CHCl₃) 10 ml와 알칼리 試藥(40% NaOH와 NH₄ OH의 同量混液) 0.2 ml를 넣고, 2分間 세게 흔들 다음 銅試藥 1 ml를 加하여 1分間 세게 흔들었다. 다음에 30% 아세트산 溶液 1 ml를 加하여 數秒間 흔들고, 液이 分離될 때까지 靜置한 다음 下層部(CHCl₃)를 試驗管에 取하고, 무수황산나트륨으로 脫水시킨후 吸光度를 測定하였다. 이때 對照液은 2% 三鹽化 아세트산 溶液을 使用하였다. 檢量線은 抽出液 대신 DMA의 2% 三鹽化아세트酸 5 ml로써, 같은 操作을 하여 作成하였으며, 그때의 檢量線은 Fig. 6과 같고, 回收率은 90.0% 였다.

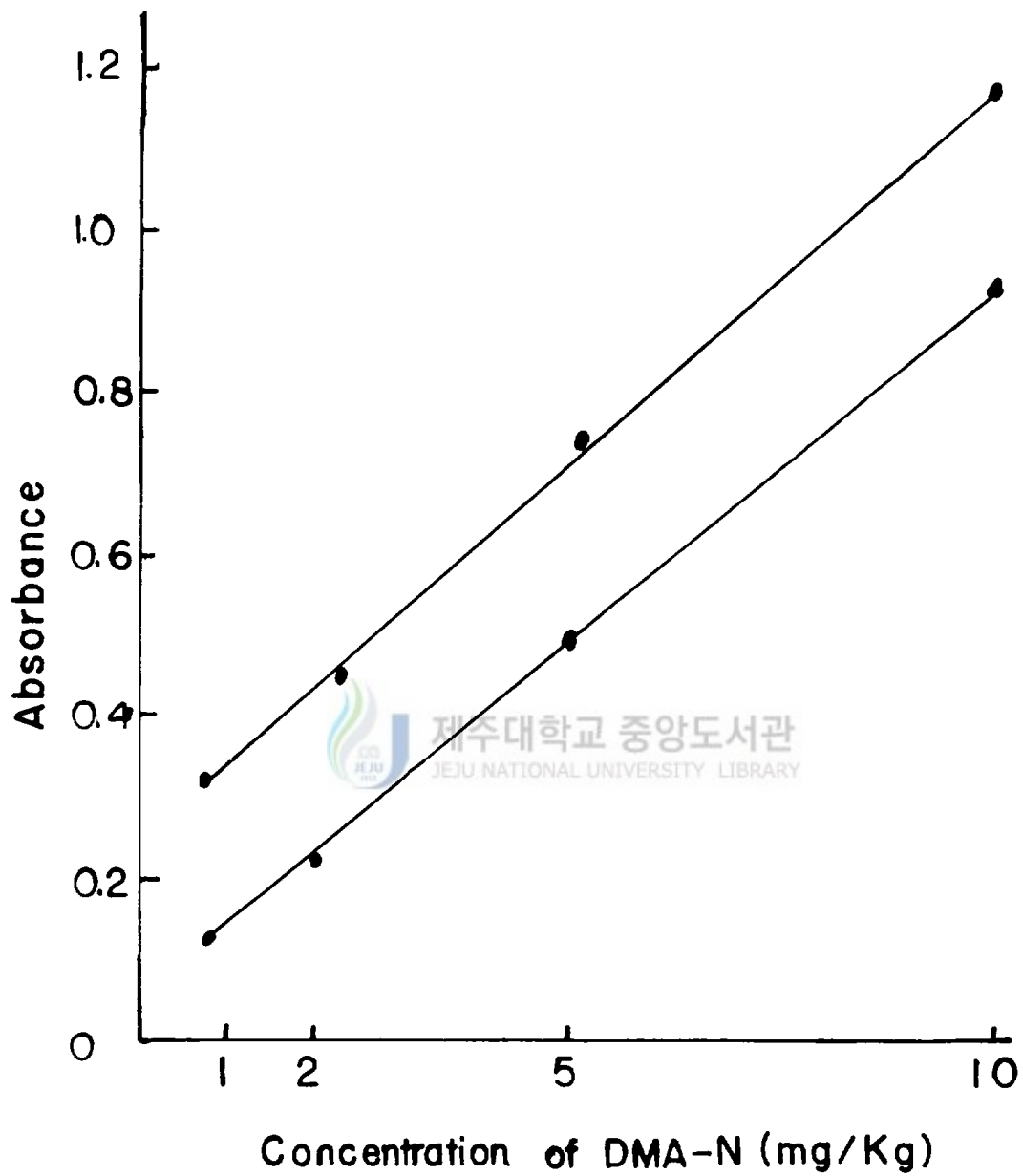


Fig. 6. Calibration and recovery curves for DMA Authentic DMA added in salt-fermented damsel fish Homogenate, B Authentic DMA

7. N-nitrosamine 定量

Fine 등(1975)에 의하여 開發되고, Havery 등(1978), James 등(1980), Theiler 등(1981 a)에 의해 改良된 mineral oil distillation GC-TEA法에 따라 定量하였다.

가. 裝置 및 試藥

Fine 등(1975)에 의해 使用된 裝置 및 試藥으로 使用하였으며, 그 裝置는 Fig. 7 과 같다.

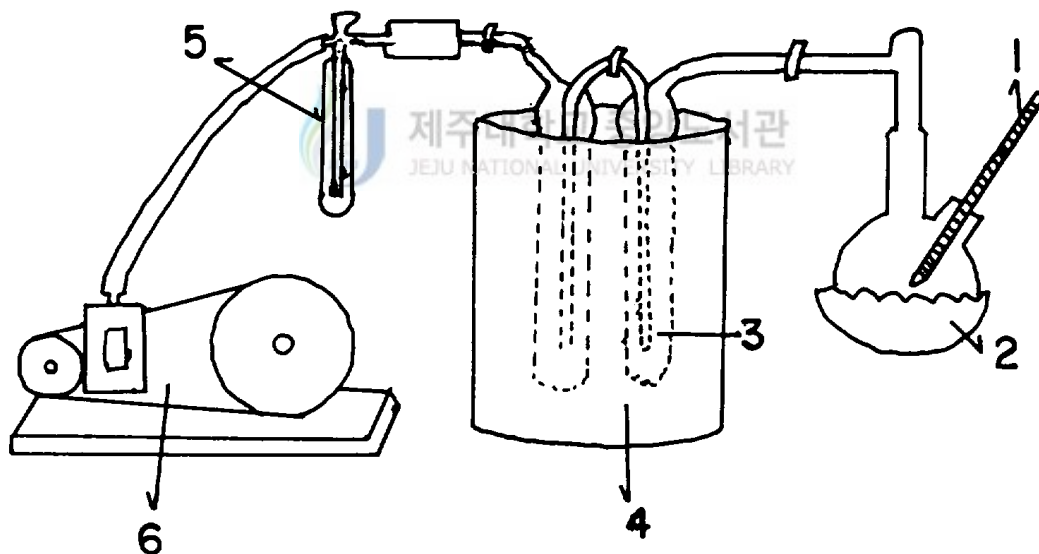


Fig. 7. Mineral oil distillation apparatus

1. Thermometer.
2. Heating mantle.
3. Vacuum trap.
4. Cold trap (liquid N_2 or Dry ice + Acetone).
5. Vacuum gauge (vacuum 2 torr).
6. Vacuum pump.

나. 試驗造作

25 g의 마쇄된 자리젓을 두개의 목이 달린 플라스크에 넣고 여기에 25 ml mineral oil을 가한 후 溫度計를 플라스크에 附着시키고 vacuum traps에 접속시켰다. 液體窒素를 vacuum traps가 있는 dewar flask에 가하고, 内部를 眞空狀態로 만든 다음 溫度 조절기를 利用하여 漸漸히 加熱하면서, 120 °C가 되게 한 다음 15分 동안 蒸溜하였다 (Fig. 7). Dewar flask 및 cold traps를 除去하고 抽出物을 녹인후, 分液여두에 移行시키고 methylene chloride 15 ml로 充分히 씻어 1分間 흔들었다. methylene chloride 層을 分液여두에 옮기고 10 ml methylene chloride로 3回 各各 1分間 흔들면서 抽出을 반복하여 抽出物을 混合하였다. 35 g의 망초를 넣은 깔대기를 通해 混合된 methylene chloride 抽出物은 濃縮裝置로 옮기고 0.5 ml까지 濃縮하였다. 이 試料溶液 0.5 μ l를 GC-TEA에 注入하여 nitrosamine을 定量하였으며 이때의 GC-TEA 條件은 Table 1과 같고 nitrosamine의 檢量曲線은 Fig. 8과 같다.

8. 酸性條件에서 nitroso 化한 試料에서 nitrosamine의 定量 및 同定

Kim 등(1984 b)의 設定한 條件에 따라 亞硝酸나트륨의 濃도가 試料 混合物에 0.05 M의 濃도가 되게 添加한 후 nitroso 化 시키고 mineral oil distillation - TEA法에 의해 N - nitrosamine을 定量하였으며, GC-Mass spectrometry法 및 UV-irradiation을 利用하여 同定하였다. 또 nitrosamine의 標準物質을 試料中 nitrosamine 抽出溶液에 添加하여 GC-TEA에 依해 retention time의 一致如否를 確認하여 同定하였다.

Table 1. Conditions for GC-TEA Analysis

Packing material	10 % Carbowax 20M 2% KOH On 80/100 Chromosorb WAW.
Column	2m. × 3mm i. d. (glass)
Carrier gas, flow rate	He, 20 ml / min.
GC Temperature	Column Oven : 100 °C injection port : 225 °C
Instrument	Varian Model 200 GC
Chart Speed	5mm / min
Ozone	20 ml / min
Analytical Pyrolyzer	450 °C
Cold Trap	-80 °C (dry ice + acetone)
Detector	TEA. Thermo Electron Corporation Model 915



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

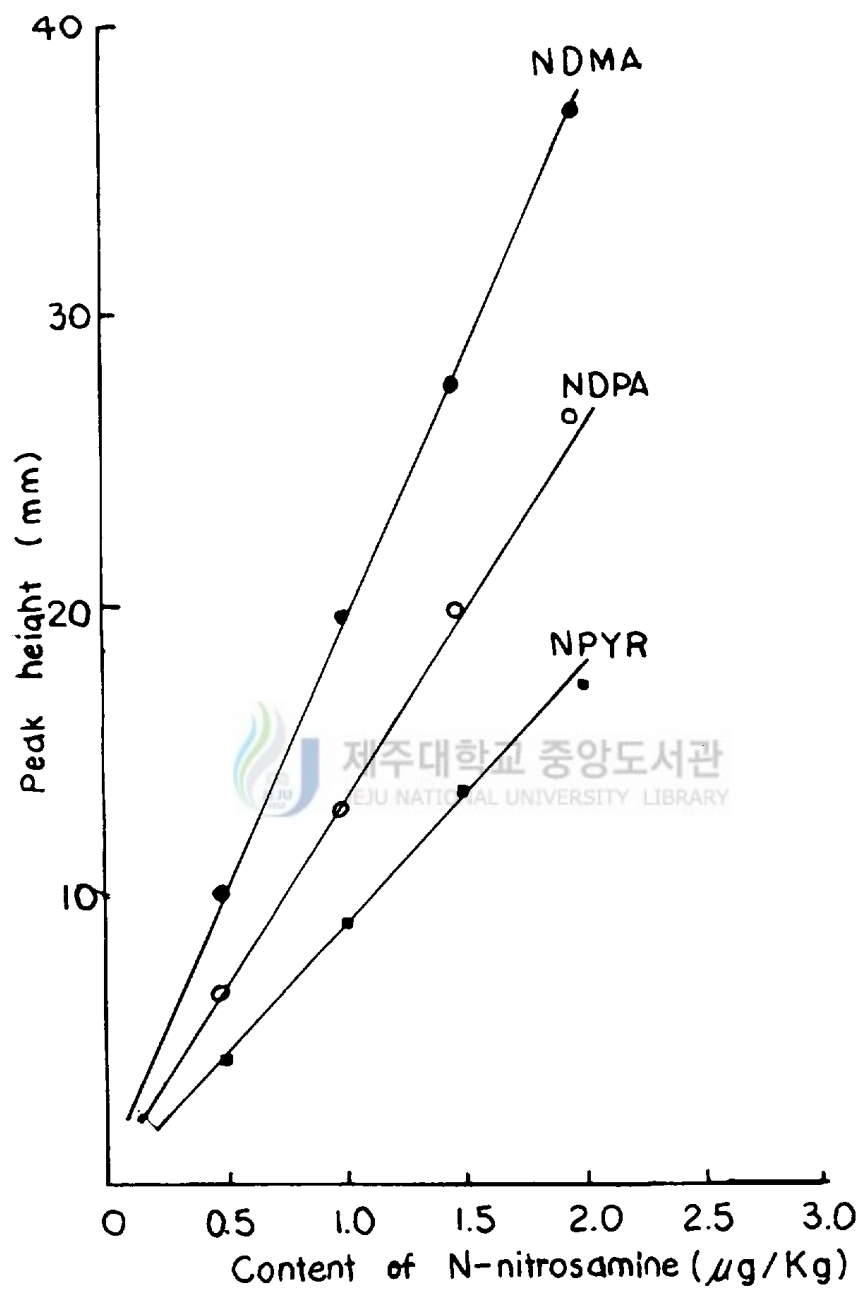


Fig. 8. Calibration curves for N-nitrosamines

IV. 結果 및 考察

1. 官能檢査에 의한 熟成度 判定

자리젓의 熟成度を 判定하기 위하여 研究室員 5名으로 panel member를 構成하고 官能檢査를 實施하였다. 그 結果 貯藏 14日에는 아가미와 복부 및 內臟에만 강한 짠맛을 느낄수 있었으나 肉部는 짠맛이 덜하여 食鹽 침투가 덜 된것으로 생각되었다. 28日째는 組織이 위축되어 容器 下層에 물이 고이기 始作하는 것으로 보아 肉內 食鹽 침투가 많이 되고 있음을 느낄 수 있었다. 그러나 젓갈로서의 風味는 느낄 수 없었다. 42日째는 市販 자리젓과 같은 固有의 風味를 나타내기 시작하였다. 56日째에 자리젓 固有의 냄새가 나고 形狀도 日常 자리젓에 가까워 完熟期에 이르고 있음을 볼 수 있었다. 70日째 맛, 촉감, 肉組織, 色澤, 냄새 등이 매우 좋았으며 熟成 過程이 길어짐에 따라 물이 점차 下層에 많이 고이기 始作하여, 84日째 以後는 風味나 色澤등이 70日째의 試料보다 떨어졌다. 따라서 자리젓의 最適熟成期는 70日 前後로 생각된다.

2. 水分 및 鹽分含量

生試料中の 水分含量은 74.0% 였고 熟成中에는 62.0~63.0%로 거의 變化가 없었으며, 市販 試料는 60.0%이었다.

鹽分은 生試料에서 0.02%의 含量을 보였고 熟成中에는 14~15%로 거의 一定하였으며 市販 試料는 역시 15%를 나타내었다.

3. 熟成에 따른 pH의 變化

Fig. 9에서 보는 바와 같이 pH의 變化는 生試料에서 6.3이던 것이 熟成과 더불어 높아져 14日에서 28日까지 급격히 增加하여 7.8이 되었다. 그 이후에는 완만한 增加를 보이다가 70日後 84日까지는 9.0으로 거의 變化가 없었으며 市販 試料는 8.8이었다.

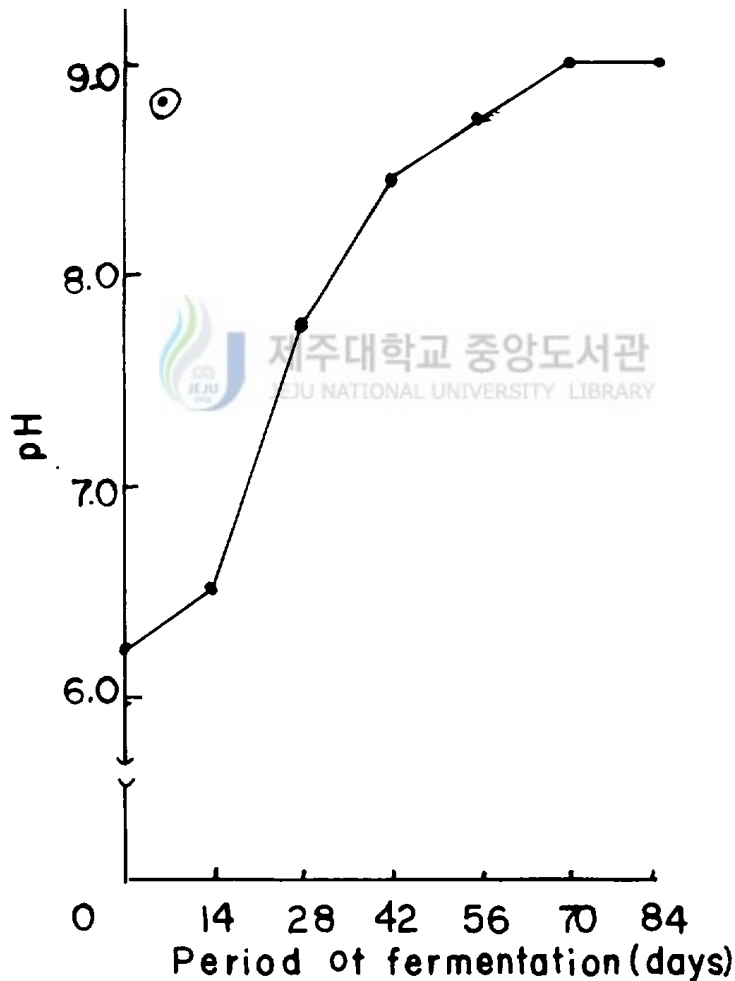


Fig. 9. Change of pH during fermentation of damsel fish.

⊙: commercial products

4. 窒酸鹽窒素와 亞窒酸鹽窒素의 變化

窒酸鹽窒素는 生試料에서 4.0 mg/kg이었던 것이 28日까지 급격히 減少할 여 3.0 mg/kg이 되었고, 熟成 42日째와, 56日째에 各各 2.8 mg/kg과 2.6 mg/kg의 含量을 나타냄으로써 一定한 減少를 보이다가 그 이후는 더 以上 減少하지 않았다. 市販用 試料도 비슷했다 (Fig. 10).

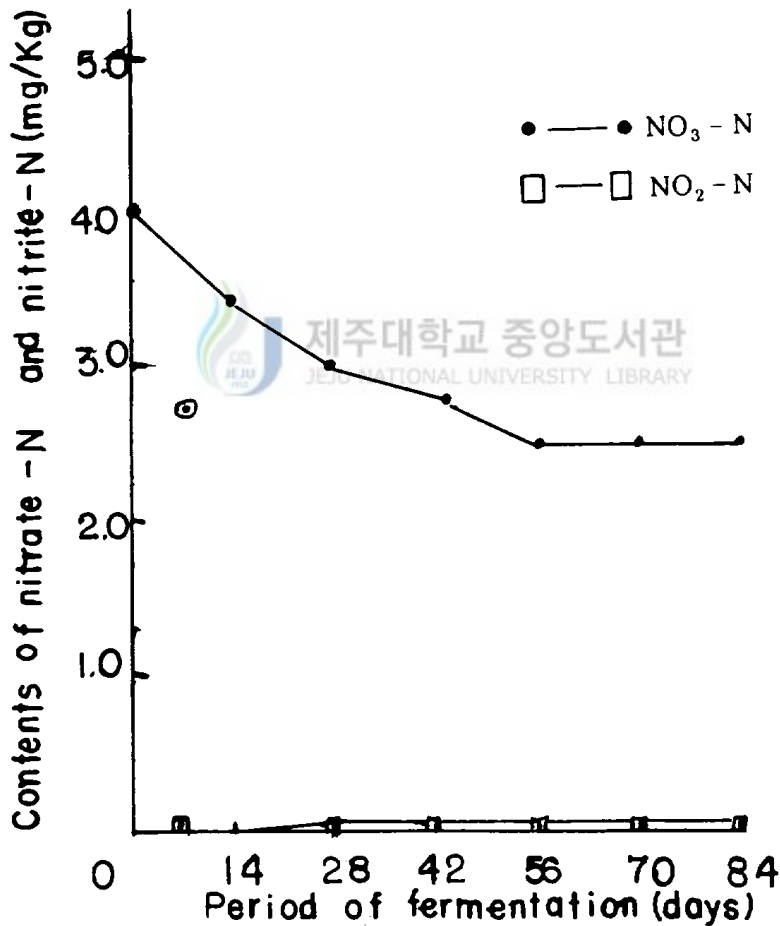


Fig. 10. Changes of contents of nitrate-N, nitrite-N during fermentation of damsel fish.

⊙□ : Commercial products.

Lee 등(1982)은 자리젓에서 $4.60 \sim 6.84 \text{ mg/kg}$, 꿀뚜기젓은 $2.13 \sim 13.8 \text{ mg/kg}$, 멸치젓은 $0.74 \sim 21.3 \text{ ppm}$ 으로 나타났으며 Moon 등(1973)은 새우젓, 조개젓, 황새기젓, 굴젓 및 醃藏 명란젓에서 $4.2 \sim 17.2 \text{ ppm}$ 으로 報告한 바 있다. 이에 비해 比較的 적은 數値를 나타냈다.

亞窒酸鹽窒素는 生試料에서 檢出되지 않았던 것이 28日째에는 흔적량을 보이다가 그 이후에도 흔적량 以上은 增加되지 않았다 (Fig. 10).

Lee 등(1982)은 자리젓에서 不檢出 $\sim 0.08 \text{ mg/kg}$, 새우젓에서 $0.06 \sim 1.50 \text{ mg/kg}$ 으로 報告하였으며, Moon 등(1973)은 새우젓, 조개젓, 황새기젓 등 젓갈류에서 흔적량 $\sim 0.8 \text{ ppm}$ 이라고 報告하였는데, 本 實驗에서도 이들의 結果와 잘 一致하여, 大部分 젓갈에서 NO_2 는 不安定하여 熟成中 그대로 殘存하고 있지 않음을 알 수 있었다.



5. TMAO 및 TMA의 變化

Fig. 11에서 보는 바와 같이 TMAO-N는 生試料에서 54.3 mg/kg 이었던 것이 24日째와 42日째에 각각 10.2 mg/kg 과 4.2 mg/kg 으로 급격하게 減少하여 生試料에 비해 7.7%의 殘存率을 보였으며 56日以後에는 檢出限界 미만이었다. 市販 試料 역시 檢出限界 미만이었다.

TMA-N은 生試料에서 12.0 mg/kg 이었던 것이 14日과 28日째에 각각 16.0 mg/kg 과 26.4 mg/kg 으로 增加가 두드러졌고 40日부터는 거의 變化가 없었다. 市販試料도 27.0 mg/kg 으로 비슷하였다.

Pyeun 등(1976)은 27°C 에서 멸치젓을 熟成시킬때 100 mg/kg 의 TMA가 檢出되었고 TMAO는 檢出되지 않았다고 報告하였는데 자리젓에서는 TMAO

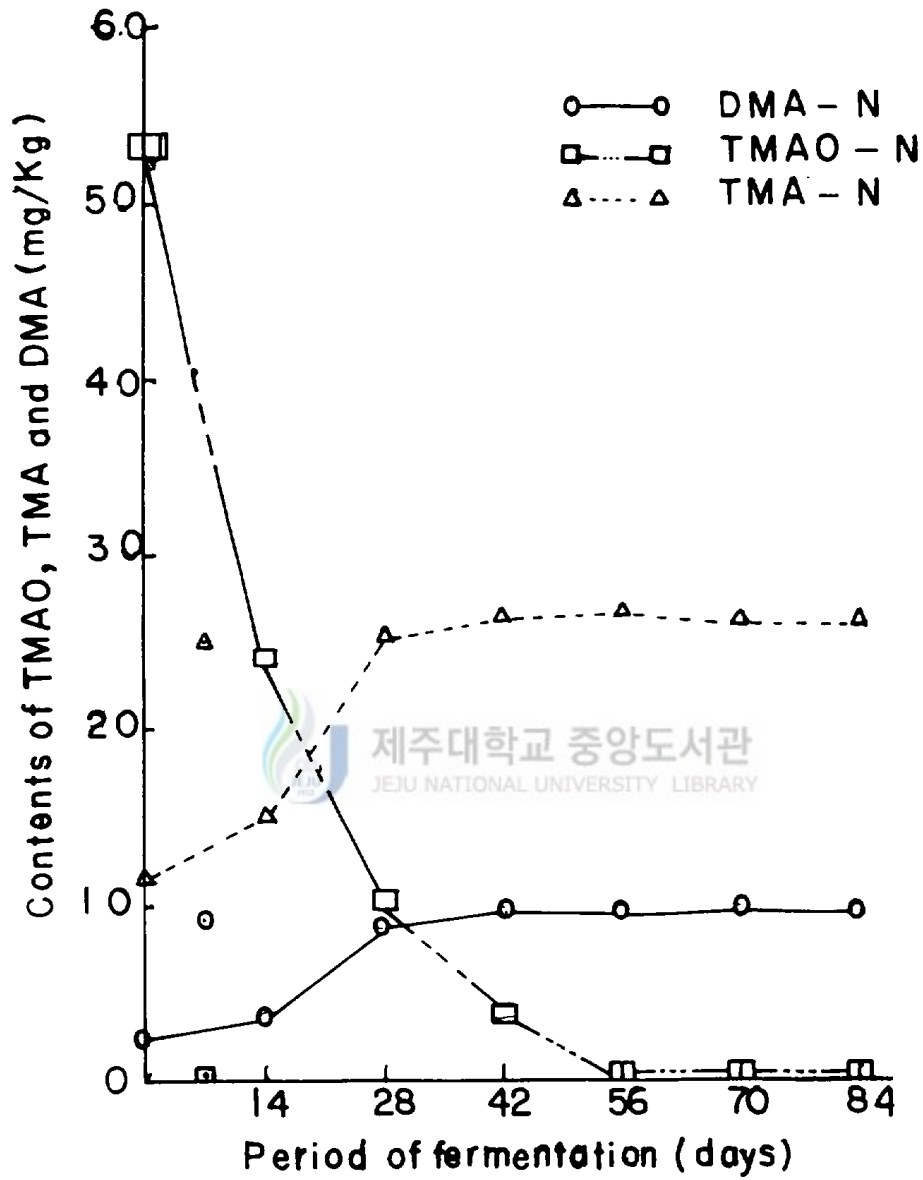


Fig. 11. Changes of contents of TMAO-N, TMA-N and DMA-N during fermentation of damsel fish.

△○□ : commercial products.

는 잘 一致하였으나 TMA의 경우는 적은 含量을 나타내었다.

Ahn 등 (1978)은 鹽乾 명태에서 TMAO-N 含量이 生試料에서 517.7 mg% 이었고 7日後 320.9 mg%이었으며, TMA-N의 含量은 生試料에서 2.1 mg%이었던 것이 鹽乾後 4.8 mg%로 增加했다고 報告하였다.

Tokunaga (1980)는 여러 種類의 魚類 보통肉中 TMA-N이 53~220 mg/kg 이라고 報告하였다. 이들의 結果와 比較할 때 자리돔에서 TMA-N은 보다 적은 값을 나타내었다.

6. DMA의 變化

Fig.11에서 보는 바와 같이 DMA-N은 生試料에서 1.3 mg/kg이었던 것이 14日과 28日째에는 3.5 mg/kg, 7.8 mg/kg으로 급격히 增加를 보이는 반면 28日 以後에는 큰 變化가 없었다. 市販試料도 역시 9.0 mg/kg 이었다.

Kawabata(1953), Kawabata 등(1978), Pyun 등(1976), Scanlan (1975), Yamada(1968), Tokunaga (1980) 등에 의하면 魚類鹽藏 또는 鹽藏醱酵 熟成中에는 肉中の TMAO가 變하여 TMA로 되고, 이것이 變化하여 DMA로 된다고 하였으며 이 때문에 魚類의 貯藏 期間이 經過함에 따라 TMAO 含量은 減少하며, TMA도 初期에는 增加하였다가 점점 減少하며 DMA만이 增加한다고 報告하였다.

Kim 등(1984 a)은 김치 熟成中 amine 類의 變化에서 DMA의 절대량은 TMAO나 TMA의 最初의 總量보다 많은 量이 生産되었음을 重要視하고, 微生物이 作用하는 醱酵食品에서는 二級 amine의 源泉이 반드시 三級 amine만이 아닌, 보다 複雜한 양상을 띠며 보다 많은 檢討가 必要하다고 하였

는데 本 實驗에서도 TMAO가 減少함에 따라 TMA, DMA가 增加하였으나 이들 3種의 amine類의 總量은 67.6 mg/kg 이었던 것이 完熟期에는 $35 \sim 37 \text{ mg/kg}$ 으로 처음 總량의 $51.8 \sim 54.7\%$ 의 殘存率을 보였는데, 이는 TMAO가 分解하여 TMA나 DMA 이외의 他 物質로 變化하는 것으로 생각되어 진다.

7. N-nitrosamine의 定量

Fig. 12의 Gas chromatogram에서 나타낸 것과 같이 nitrosamine 標準物質의 retention time은 NDMA가 2分, NDPA(nitrosodipropylamine)은 4分 NDBA(nitrosodibutylamine)은 7.8分을 보였으며 各各 그들의 peak를 나타내고 있으나 市販 試料에서는 그 retention time에서 peak가 나타나지 않는 것으로 보아, 자리젓 그 自體에는 $\mu\text{g/kg}$ 水準까지도 存在하지 않음을 알 수 있었다.

이것은 亞窒酸과 amine類와 反應하여 生成되는 N-nitrosamine의 二 前驅 物質中 亞窒酸鹽이 檢出限界 以上 存在하지 않기 때문으로 생각되어 진다.

8. 酸性條件에서 亞窒酸나트륨을 添加한 자리젓의 N-nitrosamine 含量

Tanimura(1971)는 亞窒酸鹽은 食品添加物로서 各國에서 使用되고 있는 外에도 自然食品中에 널리 分布하고 있고, 唾液中에도 含有되어 있으며 또한 胃酸이 減少할 경우 窒酸鹽이 細菌에 의해 還元되어 胃에서 亞窒酸을 生成하기도 한다고 하였다.

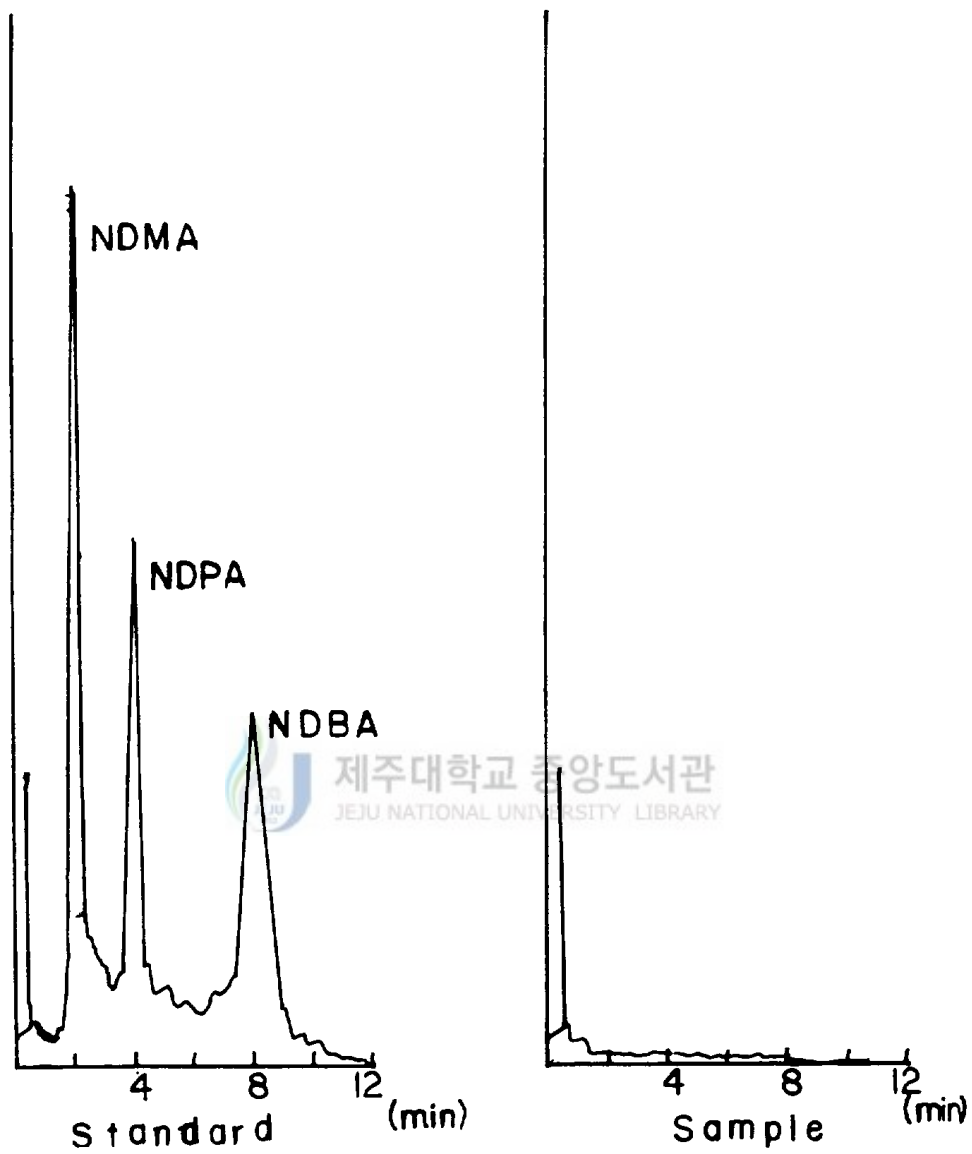


Fig. 12. Gas chromatograms of N-nitrosamine in Authentic and salt-fermented damsel fish with GC-TEA

Tannenbaum(1978)은 美國人の 唾液中 亞窒酸鹽은 6 ~ 10 mg/kg, Harada 등 (1974)은 日本人의 唾液中에 3.3 ~ 18.2 mg/kg의 亞窒酸鹽이 含有되었다고 하였으며, 1975年 Ishiwata는 食鹽에 절인 배추를 먹은후 唾液中의 亞窒酸鹽의 含量은 5 ~ 56 mg/kg을 나타낸다고 하였다.

石館(1979)에 의하면, 日本人이 一日 攝取하는 窒酸鹽은 267 ~ 422 mg/kg 으로서, WHO/FAO가 定한 ADI (acceptable daily intake)인 NO₃로 3.7 mg/kg (219 mg/60 kg) 보다도 훨씬 많은 量이라고 하였다.

또한 Ko(1979)는 韓國人の 食習慣과 唾液中의 亞窒酸鹽의 含量에 關한 報告에서 日本人보다 많다고 主張하고 있다. 이러한 事實은 우리들 胃內에도 높은 含量의 亞窒酸의 存在 可能性을 示唆하고 있다. 그래서 amine 類를 많이 含有하고 있는 자리젓을 먹었을 때 胃內에서 N-nitrosamine의 生成 可能性을 檢討하기 위하여 잘 熟成된 市販試料에서 0.05 M · NaNO₂를 添加하여 nitroso化 시킨 結果 Fig. 13과 같은 313 μg/kg의 NDMA 含量과 nitrosodibutylamine (NDBA)의 痕跡量을 보였으며 GC-MS에 의해 確認하였다.

NDMA 등의 nitrosamine 類는 紫外線에 弱하며, 4時間 以上 照射하면 破壞되는데 (Hirayama 등. 1978; Scanlan. 1975) 上記 nitrosamine 抽出試料液에 紫外線을 5時間동안 照射시킨 結果, Fig. 14에서 보는 바와 같이 peak가 없으므로 Fig. 13에서 나온 peak는 nitrosamine임을 確認할 수 있었다.

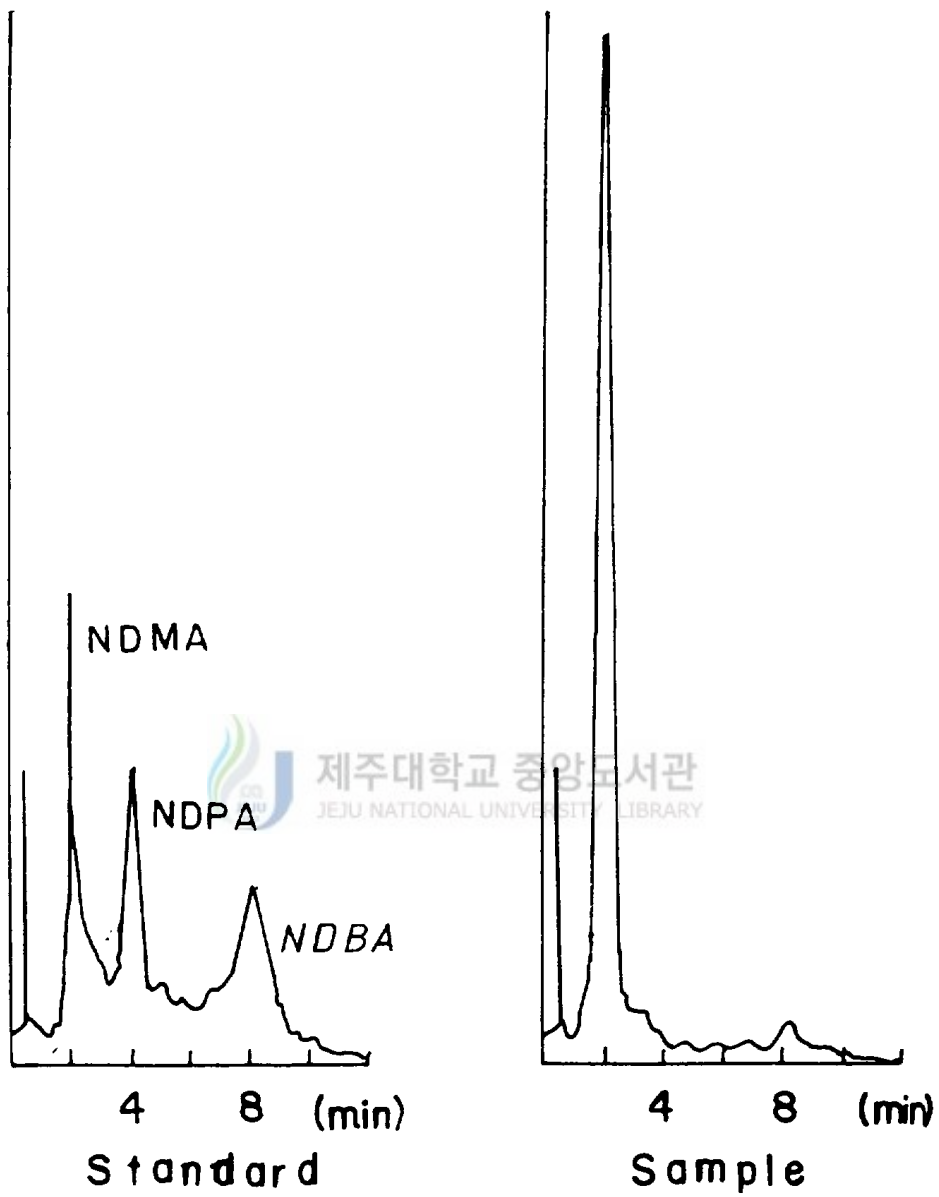


Fig.13. Gas chromatograms of N-nitrosamines in Authentic and 0.05 M NaNO_2 cured salt-fermented damsel fish with GC-TEA.

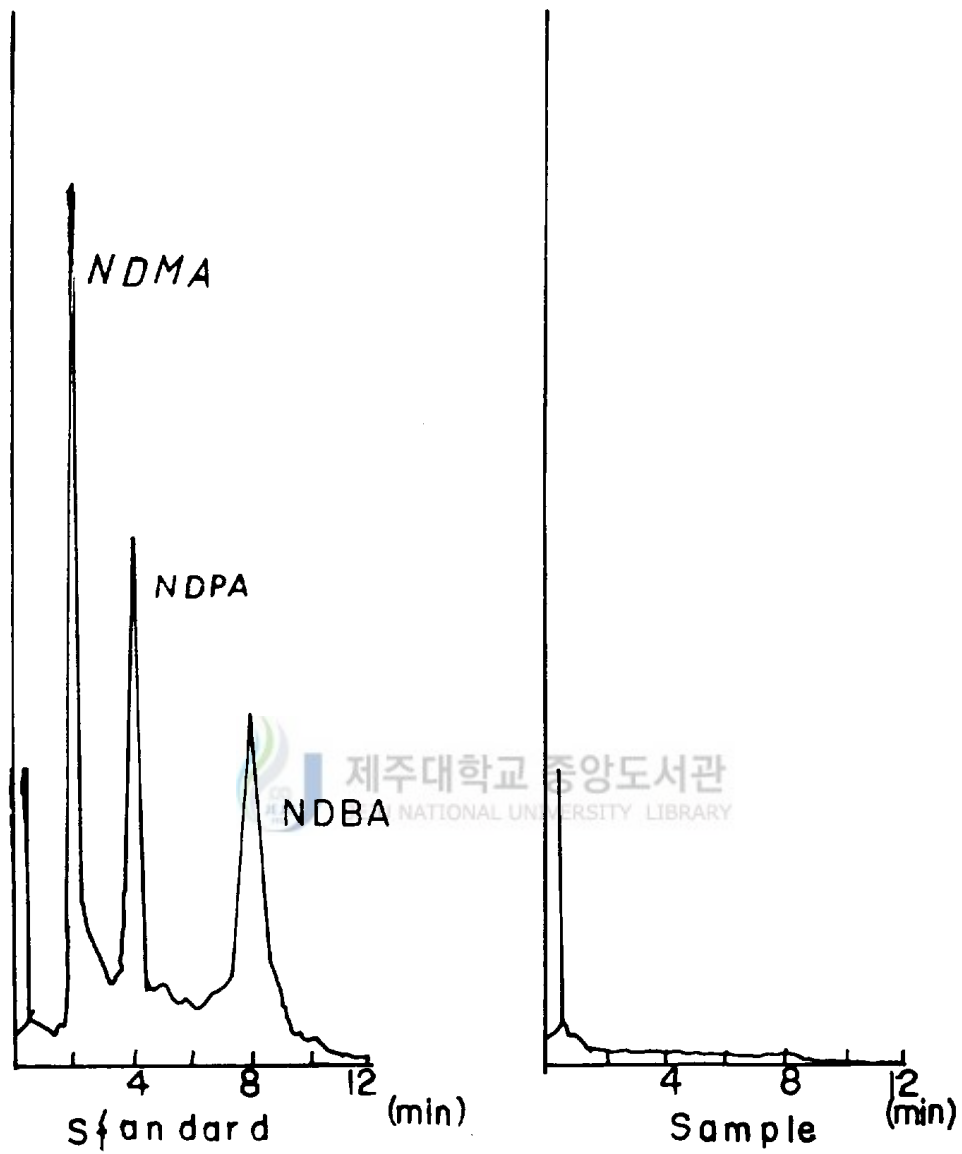


Fig. 14. Gas chromatograms of N-nitrosamines with GC-TEA after irradiating Ultra-Violet with the extract of nitrosamine in the salt-fermented damsel fish for 5 hrs.

9. 食品으로서의 자리젓과 N-nitrosamine의 生成 可能性

Mirvish (1970)는 NDMA의 生成 最適 pH가 3.4임을 밝혔고, 다른 nitroso 化合物도 pH 3.0에서 生成 最大가 되며 pH 7 이상에서는 그 生成 可能性이 희박하다고 報告했으며 이러한 事實은 여러 사람에 의해 立證되고 있다 (Fiddler 등, 1971; Hildrum 등, 1976; Scanlan, 1975; Kawabata 등, 1978; Theiler 등, 1981 a).

Table. 2에서 보는 바와 같이 자리젓中の pH는 nitrosamine 生成의 最適 pH를 크게 벗어남으로서 그 自體로서는 影響이 없을 것으로 생각된다.

그러나 Margurdt 등(1976)은 正常人의 胃液 pH가 1~4이므로 그 前驅物 質들을 含有한 食品을 攝取했을때 胃內에서 nitrosamine의 生成 可能性을 示唆하고 있다.

Ishiwata 등 (1975), Phillips(1968), Scanlan(1975), Sen 등(1982)은 高濃度의 窒酸鹽이 酸酵過程에서 亞窒酸으로 變化한다고 報告하였다.

本 實驗에서 熟成과 더불어 窒酸鹽이 減少하였으나 NO_2^- -N가 生成되지 않았고 N-nitrosamine도 生成되지 않는 點에 대하여 考察해보면, Kim 등(1984 a)은 Van slyke 法の 原理에 依한 反應에서 NO_2^- 의 소모를 생각할 수 있다고 하였다. 이 反應은 亞窒酸이 Amino acid와 反應하여 窒素가스를 生成시킬 可能性이 있다고 追論하였으며, 또한 食品中の 微生物들이 nitrosamine의 生成에 關與함을 여러 研究者들이 報告하고 있는데, Harada 등(1979)은 Rhizopus orizae, streptococcus cremoris와 Sacharmyces rouxii 등은 nitrosamine 生成을 阻害한다고 하였고, Archer 등(1978)은 Escherichia coli.B와 Saccharomyces Cerevisiae, Sacharomycopsis lipolytica 나 Bacillus brevis 등은

Table 2. Contents of NO_3^- , NO_2^- , TMAO-N, DMA-N, pH, moisture and salt during fermentation of damsel fish and those of commercial products.

Fermentation days	Detail	NO_3^- -N (mg/kg)	NO_2^- -N (mg/kg)	TMAO-N (mg/kg)	TMA-N (mg/kg)	DMA-N (mg/kg)	pH	Moisture (%)	Salt (%)
0		4.0	ND	54.3	12.0	1.3	6.3	74.0	0.02
14		3.4	ND	24.0	16.0	3.5	6.5		
28		3.0	Trace	10.2	26.4	7.8	7.8		
42		2.8	Trace	4.3	28.0	8.4	8.4	62.0	14.0
56		2.6	Trace	Trace	28.0	9.0	8.6	63.0	13.5
70		2.6	Trace	Trace	28.0	9.0	9.0	62.5	14.2
84		2.6	Trace	Trace	26.0	9.0	9.0	63.0	14.0
commercial products		3.0	Trace	Trace	27.0	9.0	8.8	60	15

ND : Non detected

TMAO-N : Trimethylamineoxide-N

TMA-N : Trimethylamine-N

DMA-N : Dimethylamine-N

nitrosamine 生成을 促進한다고 하였으며, Ayanaba 등 (1973) 과 Kunisaki 등 (1976) 도 大腸菌이나 다른 微生物들도 nitrosamine 生成을 促進하는 쪽으로 關與하고 있다고 報告하고 있다. 자리젓 熟成中에 많은 微生物이 關與하고 있음을 勘案할 때 本 實驗에서 亞窒酸이 生成되지 않은 점에 대해서는 더 많은 綜合的인 研究가 必要하리라 생각된다.

TMAO는 熟成과 더불어 減少하고, TMA, DMA는 增加하였다. 그러나 이

들 합의 총량은 같지 않으며 점점 減少하는 경향을 나타내는데 이는 TM-AO가 分解하여 一部는 이 두 物質 이외의 他 物質로 變化하고 있음을 추정할 수 있으며, 이는 Kim 등 (1984 a)의 김치 熟成中에서 amine 類의 變化樣相과 反對的인 現象을 나타내고 있다.



V. 摘 要

자리젓中 nitrosamine 生成을 追跡하기 위하여 水分, 鹽分 및 pH를 測定하고, 그 前驅物質인 窒酸鹽, 亞窒酸鹽 및 amine 類의 變化를 實驗하였다.

또 이와 比較하기 위하여 市販 자리젓을 구해 同一 實驗을 하는 한편 nitrosamine 을 定量하였다. NDMA는 GC-TEA를 利用한 mineral oil distillation 法에 의하여 定量하였다.

그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 官能檢査 結果 42日 以後부터 자리젓 固有의 風味가 생기기 始作했으며, 70日째에 맛, 냄새, 色澤등이 良好하여 最適 熟成期로 判斷되었다.

2. pH는 生試料에서 6.3이던 것이 14日에서 28日까지 급격히 上昇하여 7.8이 되었고 以後 比較的 緩慢한 增加를 보여 9.0을 나타내었으며 市販 試料도 비슷한 값인 8.8이었다.

3. 窒酸鹽窒素는 生試料에서 4.0 mg/kg 이었는데, 28日까지 급격히 減少하였다가 以後 緩慢한 減少를 보였으며, 亞窒酸鹽窒素는 生試料에서 檢出되지 않았던 것이 28日부터 痕跡량을 보이기 始作하였으나 끝내 增加는 없었고 市販 試料도 모두 비슷하였다.

4. TMAO-N는 熟成과 더불어 거의 直線的으로 減少하여 生試料에서 54.3 mg/kg 이던 것이 40日째에는 4.3 mg/kg 으로 生試料에 比하여 7.7%의

殘存率을 보였으며, 56日째는 거의 檢出限界 未滿이었다. 市販 試料도 마찬가지였다.

TMA-N는 계속 增加하여 TMAO-N와 逆相關 關係를 보이다가 70日以後에는 오히려 減少하였다.

DMA-N도 生試料에서 1.3 mg/kg 이던 것이 28日까지 급격한 增加를 보여 7.8 mg/kg 이 되었고 그以後부터 70日까지는 緩慢한 增加를 보여 9.0 mg/kg 이 되었으며, 더 以上 增加는 없었고 市販 試料도 마찬가지였다.

5. 자리젓中 nitrosamine 을 定量한 結果, 자리젓 그 自體에는 $\text{ppb}(\mu\text{g/kg})$ 水準까지도 存在하지 않았다. 그러나 胃酸性下에서 NaNO_2 를 添加하여 實驗한 結果 상당량의 NDMA 가 生成되었다.



謝 辭

本 研究를 遂行함에 있어서 始終 細心한 指導와 鞭撻을 아끼지 않으신 金洙賢博士님께 머리숙여 感謝를 드립니다. 宋大鎭博士님, 河璉桓教授님, 姜休周教授님, 朴吉淳教授님, 金在河教授님께도 깊은 謝意를 表합니다. 그리고 聲援해 주신 濟州道 保健研究所 金洪鍾 所長님, 金式裕 係長님, 여러 職員들에게 深甚한 感謝를 드립니다.

GC-TEA 및 GC-MS 를 使用하게 許諾해준 美國 MIT 營養食品 科學科 Tannenbaum 博士님, 實驗에 協助해준 wishnok 博士님께 感謝드리며, 朴換俊 君을 비롯한 食品化學研究室員들에게 感謝를 表합니다.



参 考 文 献

1. Ahn, C. W., S. A. Choi and Y. H. Park. 1979. Changes in contents of amines in the dark-fleshed fish meat during processing and storage.
(1) Formation of dimethylamine and trimethylamine in salted and dried common mackerel, gizzard-shad and sardine. Bull. Korean Fish. Soc., 12 (4) : 245-253.
2. Amano, K. and K. Yamada. 1964. A biological formation of formaldehyde in the muscle tissue of gadoid fish. Bull. Japan. Soc. Fish., 30:430-435.
3. Archer, M. C. H. S. Yang and J. D. Okun. 1978. Acceleration of nitrosamine formation at pH 3.5 by Microorganism. IARC(179) : 239 - 246.
4. Ayanaba, A., W. Verstraete and M. Alexande. 1973. Possible microbial contribution to nitrosamine formation in sewage and soil. J. of Nat. Cancer Inst., 50:811-813.
5. Bassir, O. and E. N. Maduagwn. 1978. Occurrence of nitrate, nitrite, dimethylamine, and dimethylnitrosamine in some fermented Nigerian beverages. J. Agr. Food chem., 26 (1) : 200 - 206.
6. Boyland, E., E. Nice and K. Williams. 1971. The catalysis of nitrosation by thiocyanate from saliva. Fd. cosmet. Toxicol., 9:639-643.

7. Chung, S. Y. and E. H. Lee. 1976. The taste compounds of fermented *Acetes Chinensis*. Bull. Korean fish. Soc., 9:79-110.
8. Cross, C. K., K. R. Bharucka and G. M. Telling. 1978. Determination of volatile N-nitrosamines in bacon cook-out fat by nitrite release and thin layer chromatography of fluorescent amine derivatives. J. Agr. Food Chem., 26 (3):657-660.
9. Dyer, W. J., 1945. Amines in fish muscle. 1. Colorimetric determination of TMA as the picrate salt. J. Fish. Res. Bd. Canada., 6:351-358.
10. Edward, H. and J. Gruger. 1972. Chromatographic analysis of volatile amines in marine Fish. J. Agr. Food Chem., 20(4) : 781-785.
11. Ender, F., G. Harve, A. Helgebosted, N. Koppang, R. Madsen, and L. Ceh. 1964. Isolation and identification of hepatotoxic factor in herring meat produced from sodium nitrite preserved herring. Naturwiss, 51:637-638.
12. Fan, T.Y. and D. H. Fine. 1978, Formation of N-nitrosodimethylamine in the injection port of a gas chromatograph: An artifact in nitrosamines analysis. J. Agr. Food Chem., 26 (6): 1471-1472.
13. Fazio, T., R. H. white and J. W. Howard. 1971. Analysis of nitrite and/or nitrate processed meat for N-nitrosodimethylamine. J. of the A. O. A. C., 54 (5): 1157-1159.

14. Fiddler, W., R. C. Doerr, J. R. Ertel and A. E. Wasserman. 1971. Gas Liquid Chromatographic determination of N-nitrosodimethylamine in ham. *J. of the A. O. A. C.*, 54:1160-1163.
15. _____, _____, _____, _____. 1972. Formation of nitrosodimethylamine from naturally occurring quaternary ammonium compounds and tertiary amines. *Nature*,:236-307.
16. Fiddler, W., J. W. Pensabene, E. G. Piotrowski, J. G. Phillips, J. Keating, W. J. Mergens and H. L. Newmark. 1978. Inhibition of formation of volatile nitrosamines in fried bacon by the use of curcumin solubilized α -tocopherol. *J. Agr. Food Chem.*, 26(3): 653-655.
17. Hashimoto, Y. and T. Okaichi. 1957. On the determination of trimethylamine and trimethylamine oxide; A modification of Dyer method. *Bull. Japan. Soc. Fish.*, 23(5): 269-272.
18. Havery, D. C., T. Fazio and J. W. Howard. 1972. Survey of cured meat products for volatiles N-nitrosamines: Comparison of two analytical methods, *J. Assoc. of Anal. Chem.*, 383:41-52.
19. Havery, D. C., J. H. Hotchkiss and T. Fazio. 1981. Nitrosamines in malt and malt beverage. *J. Food Sci.*, 46: 501-505.
20. Harada, K. and K. Yamada. 1979. Microbial degradation of nitrosamine. 1. Inducible break down of nitrosamines. *Bull. Japan. Soc. of Sci.*, 45: 925-928.

21. Hildrum, K. I., J. L. Williams and R. A. Scanlan. 1976. Effect of sodium concentration on the nitration of proline at different pH Levels. J. Agr. Food Chem., 23: 439-422.
22. Hirayama, T. T., T. Kiuchi and S. Fukui. 1978. Application of high performance liquid chromatograph for the determination of N-nitrosodialkylamines. J. Food Hyg. Soc., 19(45): 468 - 473.
23. Hotchkiss T. H., J. F. Bardour, L. M. Libbey and R. A. Scanlan. 1978. Nitrosamines as Thermal Energy Analyzer positive non nitroso compounds found in certain Herbicide. J. Agr. Food Chem., 26. 4 : 884-887.
24. 石館守三. 1979. 生活環境と發がん. 朝倉書店. pp. 42 - 37.
25. Ishiwata, H., 1976. Studies on *in vivo* formation of nitrous compound (VII): *In vitro* and *in vivo* formentation of dimethylnitrosamine by the mixing of different kinds of food. J. Food Hyg. Soc., 17. 6: 423-427.
26. Ishiwata, H., A. Tanimura and M. Ishidata. 1975. *In vitro* and *in vivo* formation of dimethylnitrosamine by bacteria isolate from human saliva. J. Food Hyg. Soc., 16. 4: 234-239.
27. Ishiwata, H., P. Boriboom, Y. Nakamura, M. Harada, A. Tanimura and M. Ishidate. 1975. Changes of nitrite and nitrate concentration in Human saliva. after ingestion of vegetables or sodium nitrate. J. Food Hyg. Soc. Japan, 16: 19-24.

28. Ito, Y., H. Sakuts, S. Yoko., I. Ayukawa and A, Tanimura. 1976. Studies on nitrosamines in food (VII). Increment of secondary amines in foods by cooking or processing. J. Food Hyg. Soc. Japan, 12: 404 - 407.
29. James, L. O. and O. E. Kinast. 1980. An improved procedure for the determination of volatile N-nitrosamine in bacon grace by using the mineral oil distillation Thermal Energy Analyzer method. J. Agr, Food Chem., 28:1262-1264.
30. Kamm, L., G. C. Mckeon and K. M. smith. 1965. New colorimetric method for the determination of the nitrate and nitrite content of baby foods. J. of The A. O. A. C., 48:892-899.
31. Kwabata, T.. 1953. Studies on the trimethylamine oxide reductase-1. Reduction of trimethylamine oxide in the dark muscle of pelagic migrating fish under aseptic condition. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish, 19: 505 -512.
32. 河端俊治, 石橋亨. 1974. 第二級アミンの検出と定量: 藤恒行, 内山均, 梅本 滋, 河端俊治編, 水産生物化学. 食品学 実験書, 恒星社 厚生閣 東京, pp.315 - 319.
33. Kawabata, T. and H. Ohshima, 1978. Mechanism of the N-nitrosodimethylamine formation from dimethylamine and trimethylamine and trimethylamineoxide. Bull. Japan. Soc. Fish., 44(1): 77-81.
34. Ko, Y. S.. 1979. Studies on relation of nitrate and nitrite contents

- in Koeran foods and human saliva. Korean J. Food Sci., Technol. 11. 3 : 147-152.
35. 金洙賢, 李應昊, 河端亨, 遠藤降和, 松居正己. 1984 a. 김치熟成中 N-nitrosamine 生成에 관한 研究. 韓國營養食糧學會誌. 13 (3) : 291-306.
36. Kim, S. H., J. S. wishnok and S. R. Tannenbaum. 1984 b. Formation of N-nitrosodimethylamine in Korean seafood sauce. J. Agr. Food chem.(in press).
37. Kunisaki, N., H. Matssuura and M. Hayashic. 1976. Formation of N-nitrosodimethylamine by Escherichia Coli. J. Food Hyg. Soc., 17 . :314-319.
38. Lee, E. H., S. K. Kim, J. K. Jeon, and S. H. Kim. 1982. Nitrate and nitrite content of some fermented sea foods and vegetable. Bull. Korean Fish. Soc., 15 (2) : 147-153.
39. Magee, P. N., 1957. Inhibition of protein synthesis in rat liver by dimethylnitrosamine *in vivo*. Toxic Liver Injury. 70. 605-611.
40. _____. 1971. Toxicity of nitrosamine: Their possible human health hazards. Fd. Comet. Toxicol., 9: 207-218.
41. _____. and J. M. Barnes, 1956. The production of malignant primay hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine.Br. J. Cancer, 10: 114-122.
42. _____. and M. Vandekar. 1957. The metabolism of dimethylnitrosamine

in vitro. Toxic liver injury, 70 : 600 - 605.

43. Marguardt, F. R. and J. H. Weisburger 1976. On the aetiology of gastric cancer; Mutagenicity of food extracts after incubation with nitrite. Toxicol. 15 : 97 - 100.
44. Mirvish, S. S.. 1970. Kinetic of DMA nitrosation in relation to nitrosamine carcinogenesis. J. Nat. Cancer Inst., 44 : 633 - 639.
45. Moon, B. S., Kim, J. K. Lee and J. K. Woo. 1973 Studies on nitrosamines in food(I). Contents of nitrate and nitrite in various foods. Report of NIH. Korea, 10 : 277 - 283.
46. _____, B. S. Kim, J. H. Kim, S. T. Woo, M. H. Kim and Y. J. Jang. 1975 Studies on nitrosamine in Food(III). Contents of Dimethylamine in various Foods. Report of NIH. Korea, 12 : 167 - 172.
47. Park, Y. H., S. A. Choi and Y. K. Yang, 1981. Changes in contents of amines in the dark-fleshed fish meat during processing and storage. Formation of dimethylamine and trimethylamine in salted and dried mackerel pike and spanish mackerel. Bull. Korean. Fish. Soc., 14(1) : 7-14.
48. Pensabane, I. W., W. Fiddler, C. J. Dooley, R. C. Doerr and A. E. Wasserman. 1972. Spectral and gas chromatographic characteristics of some N-nitrosamines. J. Agr. Food chem., 20. 2: 274-277.
49. Phillips, W. E. J. 1968. Change in the nitrate and nitrite content of fresh and processed spanish during storage. J. Agr. Food Chem.,

- 16: 88-91.
50. _____. 1971. Naturally occurring nitrate and nitrite in foods in relation to infant methamoglobinaemia. *Fd Cosmet. Toxicol.*, 9: 219-228.
51. Pyeun, H., B. Y. Jeoung and K. S. Hwang. 1976. Formation of dimethylamine in the course of anchovy fermentation with salt *Bull. Korean Fish. Soc.*, 9: 223-231.
52. Ronald, R. D., J. Morrison, D. P. Rounbehler, S. Fan and D. H. Find. 1977. N-nitroso compound impurities in herbicide formulations. *J. Agr. Food Chem.*, 25.6: 1416-1426.
53. Sakai, A. and A. Tanimura. 1971 a. Studies on nitrosamines in food (VII). Nitrosamines detected in foods. *J. Food Hyg. Soc.*, 12: 485-488
54. _____. _____. 1971 b. Studies on nitrosamines in food (I). *In vitro* and *in vivo* formation of dimethylnitrosamine. *J. Food Hyg. Soc.*, 12. 3: 170-176.
55. Scanlan, R. A.. 1975. N-nitrosamine in foods. *Crc critical Reviews in food technology*, 5: 357-402.
56. Sen, N. P. and Y. C. Lee. 1979. Determination of nitrate and nitrite in whey powder. *J. Agr. Food Chem.*, 27: 1277-1279.
57. Sen, M. P. and S. S. Seaman. 1982. A rapid Liquid Liquid extraction clean up methods for the determination of volatile N-nitrosamines in cooked-out bacon fat. *J. Agr. Food Chem.*:364-376.

-
58. Singer, G. M. and W. Lijusky. 1976. Naturally occurring nitrosatable compounds. 1. Secondary amines in food stuffs. *J. Agr. Food Chem.*, 24. 3 : 550-553.
59. Sung, N. J. and H. C. Yang. 1984. Changes in N-nitrosamine of Yellow Coryenia (*pseudosciaena manchrica*) during Gulbi processing and Storage. 1. Changes in nitrite and amines of Yellow Corvenia during Gulbi processing and storage. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 17(4) : 344-352.
60. Tanimura, A. 1971. Reaction of food additives with foods components in relation to nitrite. *J. Food Hyg. Soc.*, 12. 4 : 277-281.
61. Tannenbaum, S. R., M. C. Archer, J. S. Wishnok and W. W. Bishop. 1978. Nitrosamine formation in human saliva. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 60 : 251-253.
62. Tannenbaum, S.R., M. Weiman and D. Fett .1976. The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Fd. Cosmet. Toxicol.*, 14 : 549-552.
63. Tannenbaum, S. R., A. J. Sinsky, M. weisman and W. Bishop. 1974. Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 53 : 79-82.
64. Theiler, R. F., K. Sat., T. G. Aspelund and A. F. Miller. 1981 a. Model system studies on N-nitrosamine formation in cured meats: The effect of curing solution ingredient. *J. Food Sci.*, 46 : 996-998.

-
65. _____, T. C. Aspelund, K. Sato and A. F. Miller. 1981 b. Model system studies on N-nitrosamine formation in cured meat: The effect of slice thickness. J. Food Sci. 46. 691-693.
66. Tokunaga, T. 1980. Biochemical and scientific study on trimethylamine oxide and its related substance in marine fishes. Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab., 101 : 1 - 129.
67. Yamada, K. 1968. Post-mortem breakdown of trimethylamine oxide in fishes and marine invertebrate. Bull. Japan. Soc. Fish, 34. 6 : 541-551.
68. _____, M. Yamamoto and A. Tanimura. 1975. Studies on the formation of nitrosamine (IV). Kinetical studies on the carboxy methyl nitroso ured formation from Glycocyanine and sodium nitrate. J. Food Hyg. Soc., 17. 2 : 182 - 186.
69. Yim, T. K., S. P. Kwon and M. C. Yoon. 1973. Study on nitrosamines in Food: part 1. The distribution of secondary amines and nitrites. Korean J. Food Sci., Technol., 5 : 169-173.