

天然食品成分에 의한 發癌性 니트로사민生成因子 分解作用

1. 野菜抽出物の 亞窒酸鹽 分解作用*

金東洙·安芳遠**·廉東敏**·李東祐**·金善奉**·朴榮浩**
釜山産業大學校 食品工學科, **釜山水產大學 食品工學科
(1987년 6월 13일 수리)

Degradation of Carcinogenic Nitrosamine Formation Factor by Natural Food Components

1. Nitrite-scavenging Effects of Vegetable Extracts*

Dong-Soo KIM, Bang-Weon AHN**, Dong-Min YEUM**
Dong-Ho LEE**, Seon-Bong KIM**, and Yeung-Ho PARK**

Department of Food Science and Technology, Pusan Sanub University, Pusan, 608 Korea
**Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan, 608 Korea
(Accepted June 13, 1987)

The present paper was investigated to elucidate the nitrite-scavenging ability of vegetable extracts. Vegetable extracts possessed the scavenging ability of nitrite. By fractionation of vegetable extracts, nitrite-scavenging ability of garlic (*Allium sativum* for. *Pekinense*), chinese pepper (*Zanthoxylum schinifolium*), onion (*Allium cepa*), welsh onion (*Allium fistulosum*) and ginger (*Zingiber officinale*) extracts were effective in the water-soluble fraction, but carrot (*Daucus carota* var. *sativa*) in the methanol-soluble fraction. Nitrite-scavenging ability of vegetable extracts was also pH-dependent, highest at pH 1.2 and lowest at pH 6.0. Particularly, nitrite-scavenging abilities of water-soluble fractions obtained from garlic and chinese pepper were similar to that of L-ascorbic acid at pH 1.2. After vegetable extracts were treated with sodium borohydride, nitrite-scavenging ability was remarkably decreased at pH 1.2. It is assumed that reducing powers of vegetable extracts participated in their nitrite-scavenging abilities.

緒 論

亞窒酸鹽은 食肉 또는 魚肉製品의 發色劑 및 風味安定劑로써 뿐만 아니라 *Clostridium botulinum* 등 細菌의 生育抑制劑로써 食品加工 및 貯藏中에 널리 利用되고 있다^{1)~3)}.

또한 이들 亞窒酸鹽은 그 自體가 毒性을 가지는 물론 食品內 常在成分인 아민류와 反應하여 그 대부분이 發癌性 니트로사민을 生成하는 것으로 알려져 있고^{4)~6)}, 이는 食品에서 뿐만 아니라 人體나 動物의 胃內에서도 生成된다고 알려져 있다.

따라서, 니트로사민의 生成을 效果的으로 抑制하

기 위하여 많은 研究가 進行되어 ascorbate, tannic acid 유도체 및 sorbic acid 등이 니트로사민의 生成抑制에 效果가 좋은 것으로 밝혀지고 있다^{7)~11)}. 또한 bacon의 添加物로 使用되고 있는 sodium erythorbate도 니트로사민의 生成을 抑制하는 것으로 밝혀지고 있다¹²⁾.

이와 같이, 食品의 加工 및 貯藏中에 使用되는 添加物에 의한 니트로사민의 生成抑制에 관하여는 많은 研究가 이루어져 왔지만, 아직까지 그 生成抑制機構에 關係는 完全히 解明이 되지 않고 있으며, 또한 食品自體의 共存成分에 의한 食品 및 生體內에 있어서 니트로사민의 效果的인 抑制에 관하여도 거의

* 이 논문은 한국학술진흥재단의 1986년도 연구비에 의하여 있음.

밝혀져 있지 않다.

따라서, 本 研究에서는 니트로사민의 生成에 있어서 가장 直接的인 生成因子가 亞硝酸이기 때문에 이들 亞硝酸을 效果의로 分解하는 것이 곧 니트로사민의 生成抑制와 直結된다고 볼 수 있으므로 食品의 安全性 評價를 위한 手段의 하나로 天然食品成分中에 存在하는 亞硝酸鹽 分解因子를 檢索하기 위하여 우리가 日常生活에서 널리 섭취하고 있는 野菜類中에서 마늘, 산초, 생강, 양파, 파 및 당근 등을 試料로 하여 이들의 亞硝酸鹽 分解作用을 研究·核討하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

本 實驗에 使用한 野菜類는 마늘, 산초, 생강, 양파, 파, 당근으로 마늘, 산초, 생강은 부산 새벽시장에서 양파, 파, 당근은 부산대연시장에서 各各 購入하여 實驗에 使用하였다.

2. 實驗方法

1) 野菜抽出液의 調製

各 試料 200 g 을 細切하여 均질화 시킨 다음 증류수를 500 ml 가하여 5時間동안 교반시켰다. 교반후 원심분리하여 上澄液을 여과하여 水溶性劃分을 얻었다. 그리고, 잔사에 methanol 200 ml 을 가하여 上記 조작으로 얻은 抽出液을 methanol 可溶性劃分으로 하였다.

2) 野菜抽出液에 의한 亞硝酸鹽 分解能測定

野菜抽出液의 亞硝酸鹽 分解能은 Fig. 1과 같은 方法으로 測定하였다. 즉, 10 mM 亞硝酸나트륨 溶液 2 ml 에 所定濃度의 試料를 가하고 여기에 0.1 N HCl (pH 1.2) 및 0.2 M 구연산 緩衝溶液(pH 4.2 및 6.0)을 使用하여 反應溶液의 pH를 각각 1.2, 4.2 및 6.0으로 調整하여 反應溶液의 부피를 10 ml 로 하였다. 이를 37°C 에서 1時間동안 反應시킨 다음 反應液을 各 各 1 ml 씩 취하고 여기에 2% acetic acid 5 ml, Griess 시약(30% acetic acid 로 各各 調製한 1% sulfanylic acid 와 1% naphthylamine 을 1:1 比率로 混合한 것, 使用值前에 調製) 0.4 ml 를 가하여 잘 混合시켜 15 分間 室溫에 放置시킨 후 520 nm 에서의 吸光度를 測定하여 殘存하는 亞硝酸量을 구하였다. 그리고 空試驗은 Griess 시약 대신 증류수를 0.4 ml 가하여 上記와 同一하게 行하였다. 亞硝酸鹽 分解能은 野菜抽出

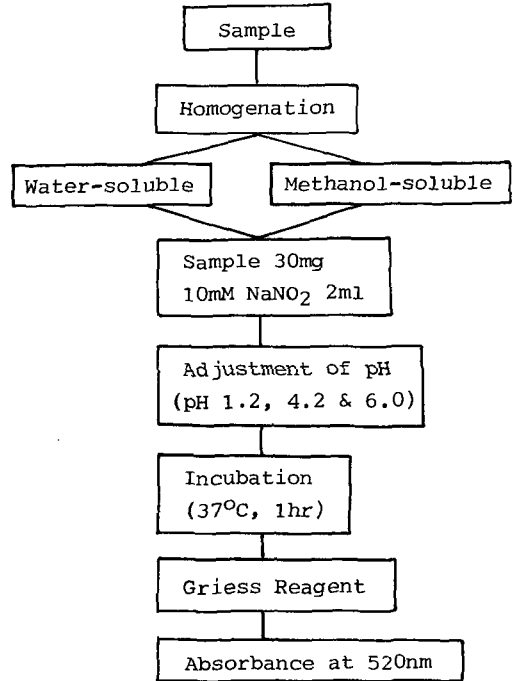


Fig. 1. Flow chart for experiment.

物 添加前後에 殘存하는 亞硝酸鹽의 百分率(%)로써 나타내었으며 이 수치가 큰 것일수록 亞硝酸鹽 分解能이 크다는 것을 意味한다.

3) 野菜抽出液中的 亞硝酸鹽의 定量

亞硝酸鹽 分解能測定에 使用한 濃度의 試料量을 취하여 증류수로써 10 ml 로 한 다음, 37°C 에서 1時間 反應시켰다. 反應後, 反應液 1 ml 를 취해 2% acetic acid 와 Griess 시약을 各 各 5 ml, 0.4 ml 가하여 發色시킨 후 520 nm 에서 吸光度를 測定하여 미리 作成한 檢量曲線을 使用하여 亞硝酸鹽 含量을 算出하였다.

4) 野菜抽出液中的 ascorbic acid 의 定量

亞硝酸鹽 分解能測定에 使用한 濃度의 試料를 취하여 2% HPO₃ 溶液으로 100 ml 로 하여 이 液을 5 ml 취하여 0.2% 2,6-dichlorophenolindophenol 溶液을 1방울씩 가하여 液이 선홍색을 띄는 것을 確認한後 2.5% 亞硝酸鐵(III) 溶液 2 ml 를 가하여 37°C 의 水조에서 3時間 反應시켰다. 反應後, 얼음속에서 冷却시키면서 85% 황산 5 ml 를 천천히 注加하고, 2% 2,4-dinitrophenylhydrazine 溶液 1 ml 를 添加하여 30分 동안 放置시킨 다음 540 nm 에서 吸光度를 測定하여 ascorbic acid 만으로 上記 操作과 同一하게 行하여 구한 檢量曲線으로부터 ascorbic

acid를 定量하였다.

5) 還元 野菜抽出液의 調製

野菜抽出液을 6 N-NaOH 溶液으로 pH 8로 調整하고, 여기에 sodium borohydride(NaBH₄)를 150 mg 가 하여 室溫에서 하룻밤 교반시키면서 野菜抽出液이 가지고 있는 還元能을 消失시켰다. 反應溶液中에 殘存하는 sodium borohydride는 6 N-HCl로 分解시켜 反應을 정지시켜 還元 野菜抽出液을 얻었다.

實驗 結果

1. 野菜抽出液에서 分離한 水溶性劃分의 亞窒酸鹽 分解能

Fig. 2는 pH의 變化에 따른 野菜抽出液에서 얻은 水溶性劃分의 亞窒酸鹽 分解能을 나타낸 것이다. 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解作用은 反應溶液의 pH가 낮을수록 높게 나타나 各試料 모두 pH 1.2에서 80% 이상의 높은 分解能을 나타내었으며, 특히 파, 산초, 마늘에서 그 分解能이 높게 나타났다. 그리고 各試料 모두 pH가 증가할수록 分解能의 程度에는 다소 差異가 있으나 대체적으로 減少하는 傾向을 나타내었다.

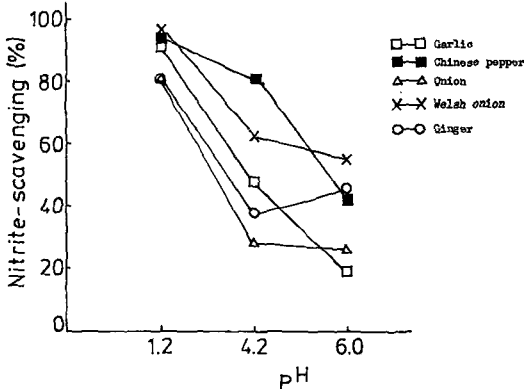


Fig. 2. Nitrite-scavenging effect of water-soluble fractions obtained from each vegetable extract under different pH conditions.

2. 野菜抽出液에서 分離한 methanol 可溶性劃分의 亞窒酸鹽 分解能

各 pH에 따른 methanol 可溶性劃分의 亞窒酸鹽 分解能程度를 Fig. 3에 나타내었다. Methanol 可溶性劃分의 亞窒酸鹽 分解能은 水溶性劃分과 비슷한 傾向을 나타내어 pH가 酸性側으로 갈수록 分解能은 높게 나타났으며 파, 양파, 당근은 pH 1.2에서 80% 이상의 分解能을 보였으나 마늘, 생강 및 산초는 오히려 pH 1.2에서 보다 pH 4.2에서 亞窒酸鹽 分解能

이 다소 높게 나타났다.

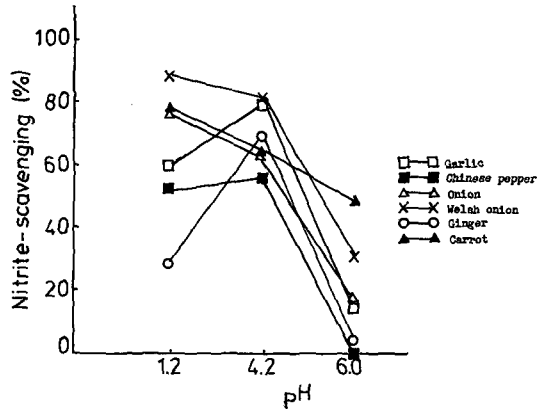


Fig. 3. Nitrite-scavenging effect of methanol-soluble fractions obtained from each vegetable extract under different pH conditions.

3. 亞窒酸鹽 分解能에 미치는 野菜抽出液의 亞窒酸鹽含量的 影響

Table 1. Nitrite content of each vegetable extract

Samples	Nitrite (μg/30mg of each sample)
Garlic	0.44
Chinese pepper	0.30
Onion	0.11
Welsh onion	0.10
Ginger	1.37
Carrot	2.16

野菜抽出液이 나타내는 亞窒酸鹽 分解能에 있어서 各試料間에 나타나는 다소간의 差異가 試料自體의 亞窒酸鹽含量에 起因하고 있는지의 여부를 確認하기 위하여 各試料 野菜抽出液에 含有되어 있는 亞窒酸鹽含量을 調査하여 Table 1에 나타내었다.

당근과 생강의 亞窒酸鹽含量은 건물 30 mg 당 各各 2.16과 1.37 μg 이었고, 양파와 파는 各各 0.11과 0.10 μg, 마늘과 산초는 0.44와 0.30 μg 을 나타내어 양파와 파에서 亞窒酸鹽含量이 가장 적었고 당근에서 가장 含量이 많게 나타났다. 이들 試料의 亞窒酸鹽 分解能 또한 亞窒酸鹽含量이 낮은 양파나 파에서보다 亞窒酸鹽含量이 높은 마늘, 산초 등에서 높게 나타나는 것으로 보아 試料에 含有되어 있는 亞窒酸鹽이 이들 野菜類가 나타내는 亞窒酸鹽 分解能에 直接的인 影響을 미치지 않는 것으로 나타났다.

4. 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解能程度

野菜抽出液이 나타내고 있는 亞窒酸鹽 分解作用

의 정도가 어느 정도인지를 밝히기 위하여 亞窒酸鹽 分解劑로 널리 알려져 있는 ascorbic acid와 比較 하여 Fig. 4에 나타내었다.

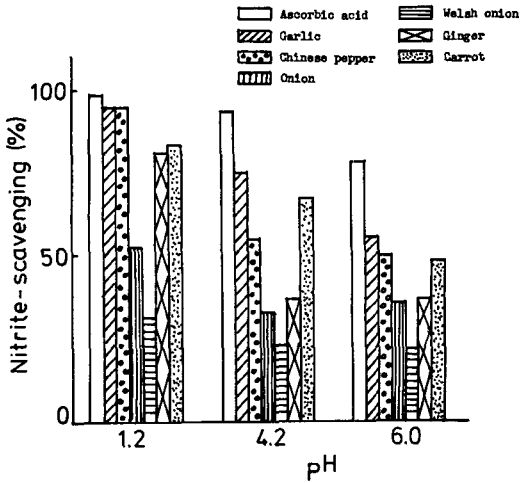


Fig. 4. Comparison of nitrite-scavenging ability between ascorbic acid and each vegetable extract.

試料의 건물량과 同量의 ascorbic acid 즉 10 mg 씩을 취하여 亞窒酸鹽 分解能을 구하여 各各을 비교 한 結果 ascorbic acid는 모든 pH 영역에서 85% 이상의 높은 分解能을 나타내었고, 마늘과 산초가 pH 1.2에서 ascorbic acid와 거의 同等한 分解能을 나타내었으며 생강과 당근도 비교적 높은 分解能을 나타내었다. 그러나 pH가 증가할수록 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解能은 減少하는 傾向을 나타내었으며 그 程度는 ascorbic acid 보다 훨씬 크게 나타났다.

5. 亞窒酸鹽 分解能에 미치는 野菜抽出液中の ascorbic acid 含量의 影響

野菜類에는 ascorbic acid가 含有되어 있어서 本實驗에 使用된 野菜抽出液이 나타내는 亞窒酸鹽 分解作用이 野菜類에 含有되어 있는 ascorbic acid에

Table 2. Ascorbic acid contents of each vegetable extract

Samples	Ascorbic acid (μg/30mg of each sample)
Garlic	4.1
Chinese pepper	10.1
Onion	4.6
Welsh onion	3.8
Ginger	6.9
Carrot	0.3

의하여 어느 정도 起因하는가를 Table 2에 나타내었다. 試料 건물 30 mg에 含有되어 있는 ascorbic acid의 量을 調査한 結果, 산초의 경우 10.1 μg/30mg으로 그 含量이 가장 높았고 당근이 0.3 μg/30mg으로 가장 적게 나타났다. 이 結果는 Fig. 4의 結果와 比較하여 볼 때 pH 1.2에서 ascorbic acid 10 mg이 나타내는 亞窒酸鹽 分解能과 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解能이 거의 비슷한 것으로 보아 이들 野菜抽出液에 含有되어 있는 ascorbic acid가 건물당 차지하는 比率는 아주 적으므로 野菜抽出液이 나타내는 亞窒酸鹽 分解能에 ascorbic acid의 關係도 無示할 수는 없으나 野菜抽出液이 갖는 亞窒酸鹽 分解能은 ascorbic acid 이외의 어떤 다른 因子가 關係하고 있는 것으로 推定된다.

6. 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解能에 미치는 酵素의 影響

Table 3은 野菜抽出液을 80°C에서 10分間 加熱하여 酵素의 活性을 失活시킨 다음 加熱前後의 亞窒酸鹽 分解能을 나타낸 것이다. 그 結果, 加熱하기 前의 亞窒酸鹽 分解能과 加熱後의 亞窒酸鹽 分解能에 있어서 試料 모두 모든 pH 영역에서 뚜렷한 有意差를 나타내지 않았다. 이러한 結果로 미루어 보아 이들 野菜抽出液이 나타내는 亞窒酸鹽 分解作用에는 野菜類에 存在하는 酵素의 關係가 극히 미약한 것으로 나타났다.

Table 3. Effect of heating on nitrite-scavenging of each vegetable extract

Samples	Nitrite-scavenging, %		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Garlic	92.90(92.90)*	40.80(48.80)	19.20(24.00)
Chinese pepper	88.10(95.20)	67.40(81.60)	42.30(42.30)
Onion	79.80(81.00)	30.60(26.60)	26.90(26.90)
Ginger	69.07(66.67)	45.90(38.78)	51.90(46.10)
Welsh onion	70.24(97.60)	35.24(63.30)	33.08(55.80)

*The numbers in parentheses indicate the value without heating. Each vegetable extract was maintained at 80°C for 10 min.

Table 4. Effect of reducing ability on nitrite-scavenging of each vegetable extract

Samples	Nitrite-scavenging, %		
	pH 1.2	pH 4.2	pH 6.0
Garlic	9.84(99.05)*	38.20(46.13)	21.75(30.40)
Chinese pepper	20.86(99.29)	54.65(74.70)	45.41(72.89)
Onion	16.23(95.48)	41.10(46.94)	35.24(56.15)
Carrot	7.35(80.98)	25.40(53.67)	20.75(36.15)
Ginger	19.85(99.05)	27.46(41.20)	25.10(45.60)
Welsh onion	17.76(94.05)	53.79(65.10)	52.96(66.35)

* The numbers in parentheses indicate the values before reducing by NaBH₄.

7. 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解能에 대한 還元因子의 影響

野菜抽出液中에 含有되어 있는 還元因子가 亞窒酸鹽 分解能에 어느 程度 關係하는지를 밝히기 위하여 강력한 還元劑인 sodium borohydride를 使用하여 野菜抽出液이 가지고 있는 還元能을 消失시킨 다음, 亞窒酸鹽 分解率을 구하여 還元能의 消失되기 前의 分解率과 比較하여 Table 4에 나타내었다. 그 結果 pH 1.2에서는 還元能의 消失되고 난 後에 나타나는 亞窒酸鹽 分解能이 還元能 消失前보다 試料 모두에서 그 程度가 5~10배 이상 減少하였고, pH 4.2와 pH 6.0에서도 pH 1.2에서 보다는 그 減少程度가 다소 減어지지만, 還元能 消失後의 亞窒酸鹽 分解能의 減少하는 傾向이 나타났다. 이와 같이 還元能 消失後에 이들 野菜抽出液이 가지는 亞窒酸鹽 分解能이 크게 減어지는 것으로 보아 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解作用에는 還元力을 가지고 있는 物質의 關係가 큰 것으로 나타났다.

考 察

니트로사민은 2급아민과 亞窒酸과의 反應으로 용이하게 生成되고, 또한 이의 直接的인 生成因子가 亞窒酸이기 때문에 亞窒酸鹽의 效果의인 分解因子를 檢討한 結果, 本 實驗에 使用한 日常生活에서 常食하고 있는 野菜類에 전반적으로 亞窒酸鹽 分解能이 강하게 나타났는데 마늘·산초·생강·양파 및 파 등은 水溶性 劃分에서 당근은 methanol 可溶性 劃分에서 그 效果가 높게 나타났다. 이들 野菜抽出液의 亞窒酸鹽 分解作用을 檢討한 結果, 野菜抽出液中에 含有된 ascorbic acid의 含量이 적다는 點(Table 2), 酵素失活 前後의 亞窒酸鹽 分解能에 變化가 없었다는 點(Table 3) 등으로 보아 이들 野菜抽出物이 나타내는 亞窒酸鹽 分解能에는 野菜抽出物에 存在하는 ascorbic

acid나 酵素의 關係는 거의 影響을 미치지 않는 것으로 밝혀졌다. 또한 野菜抽出物을 NaBH₄로 還元力을 消失시키고 난 後에 亞窒酸鹽 分解能이 그전에 비하여 激減하는 것으로 보아 野菜抽出物중에 含有된 還元性 因子가 亞窒酸鹽 分解能에 크게 기여하고 있는 것으로 밝혀졌다(Table 4). 野菜類中에는 ascorbic acid¹⁰⁾, phenol 化合物¹³⁾ 및 SH 化合物¹⁴⁾ 등의 還元力이 강한 成分이 含有되어 있으므로 本 實驗의 結果로 비추어 볼 때, 이들 成分中에서도 특히 3-hydroxy-2-pyranone 과 같은 phenol 化合物¹⁵⁾이 亞窒酸鹽 分解에 크게 關係하는 것으로 생각된다. 일반적으로 亞窒酸鹽 分解劑로써 널리 알려져 있는 還元性物質인 ascorbic acid¹⁰⁾가 亞窒酸을 nitric oxide (NO)로 分解시키는 것으로 미루어 보아 本 實驗에 使用된 野菜抽出物이 갖는 還元性 因子에 의한 亞窒酸鹽 分解도 이와 同一한 機構로 進行될 것으로 생각된다.

한편, 野菜抽出物의 亞窒酸鹽 分解能에는 pH 依存性이 크게 나타나 pH 4.2와 pH 6.0에서 보다는 强산성영역인 pH 1.2에서 分解能이 특히 높게 나타났다. 니트로사민은 强산성조건 특히 人體나 動物의 胃内의 pH 조건에서 용이하게 生成되므로 本 實驗에서와 같이 强산성조건하에서 野菜抽出物의 亞窒酸鹽 分解能의 亞窒酸鹽 分解劑로 널리 알려져 있는 ascorbic acid와 同一한 效果를 나타낼 정도로 亞窒酸鹽 分解能의 뛰어난 事實은 生體內 특히 胃内에서 니트로사민의 生成抑制에 크게 기여하리라 생각된다.

要 約

日常生活에서 널리 攝取하고 있는 野菜類를 使用하여 니트로사민의 직접적인 生成因子인 亞窒酸鹽 分解作用에 關係하여 檢討하였는데, 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1. 마늘, 산초, 생강, 양파 및 파 등은 水溶性劃分에서 당근은 methanol 可溶性劃分에서 各各 亞窒酸鹽 分解能이 높게 나타났다.
2. 反應溶液의 pH 變化에 따른 亞窒酸鹽 分解能은 pH 1.2에서 가장 컸으며, pH가 증가할수록 分解能은 減少하였다.
3. 各 試料를 10 mg씩 취하여 얻은 亞窒酸鹽 分解能을 同量의 L-ascorbic acid와 比較한 경우, 마늘과 산초가 水溶性劃分에서 L-ascorbic acid와 거의 비슷한 分解能을 나타내었다.
4. 各 試料를 NaBH₄로 처리하여 還元能을 消失시킨 후에 測定한 亞窒酸鹽 分解能은 pH 1.2에서 試料 모두 그 값이 顯著하게 減少하였다.

文 獻

- 1) William, L. 1970. Nitrosamines as environmental carcinogens. *Nature* 225, 21—23.
- 2) Roberts, T. A. 1975. The microbiological role of nitrite and nitrate. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1735—1760.
- 3) Seishi, T. and Y. Nakao. 1971. Effect of nitrate during curing. *J. Japan Soc. Food Sci. Tech.* 18(1), 1—7.
- 4) Rorald, W. 1975. Naturally occurring nitrate/nitrite in foods. *J. Sci. Food Agric.* 26, 1735—1742.
- 5) Schoental, R. 1960. Carcinogenic action of diazomethane and of nitroso-N-methylurethan. *Nature* 188, 420—421.
- 6) Shigeyoshi, O. 1974. Advances in chemical carcinogenesis by N-nitroso compounds. *J. Food Hyg. Soc. Japan* 15(6), 419—423.
- 7) Ender, F. et al. 1964. Isolation and identification of a hepatotoxic factor in herring meal produced from sodium nitrite preserved herring. *Nature* 51, 637—638.

- 8) Sen, N. P., D. C. Smith and L. Schwinghamer. 1969. Formation of N-nitroso amines from secondary amines and nitrite in human and animal gastric juice. *Food Cosmet. Toxicol.* 7, 301—307.
- 9) Mirvish, S. S., L. Wallcave, M. Eagen and P. Shubik. 1972. Ascorbate-nitrite reaction; possible means of blocking the formation of carcinogenic N-nitroso compounds. *Science* 177, 65—68.
- 10) Gray, J. J. and J. R. Dugan. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J. Food Sci.* 40, 981—984.
- 11) Tanaka, K., K. C. Chung, H. Hayatsu and T. kada. 1978. Inhibition of nitrosamine formation in vitro by sorbic acid. *Food Cosmet. Toxicol.* 16, 209—212.
- 12) Fiddler, W., J. W. Pensabene, J. C. Fagan, E. J. Throne and A. E. Wasserman. 1973. Use of sodium ascorbate or erythorbate to inhibit formation of N-nitrosodimethylamine in frankfurters. *J. Food Sci.* 38, 1084
- 13) Kurechi, T., K. Kikugawa and S. Fukuda. 1980. Nitrite-reacting substances in Japanese radish juice and their inhibition of nitrosamine formation. *J. Agric. Food Chem.* 28, 1265.
- 14) 湯上進·木村雄吉·齋藤浩. 1971. 香辛料의 化學(2); 香辛料의 抗酸性につして. *食品工業* 14(6), 57—65.
- 15) Karl W. N., I. Baker, M. Molina, J. S. Wisnok and S. R. Tannenbaum. 1986. Characterization of a nitrite scavenger, 3-hydroxy-2-pyranone, from Chinese Wild Plum Juice. *J. Agric. Food Chem.* 34, 215—217.
- 16) Toshiharu, K., H. Shazuki and T. Ishibashi. 1974. Effect of ascorbic acid on the formation of N-nitrosodimethylamine in vitro. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.* 40(12), 1251—1256.