J. Fd Hyg. Safety 17(4), 201–205 (2002)

금귤이 N-nitrosodimethylamine의 생성에 미치는 영향

이수정 · 신정혜 · 성낙주†
경상대학교 식품영양학과 · 농업생명과학연구원

Effect of Kumquat on N-nitrosodimethylamine Formation

Soo-Jung Lee, Jung-Hye Shin and Nak-Ju Sung
Dept. of Food Science and Nutrition, Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

ABSTRACT – When it added to each designed diet groups such as control, nitrate rich, amine rich and nitrate-amine rich diet under simulated gastric conditions, effect of kumquat (*Fortunella mararita*) juice on formation of N-nitrosodimethylamine (NDMA) was studied. Inhibition on NDMA formation was the highest in the amine rich diet, as 69.4±2.4%, when the juice of 10ml added to its digestate. Phenolic portion of C_{18} sep-pak cartridge in kumquat juice were separated into 20 kinds of a phenolic compounds using HPLC. These phenolic fractions such as fraction no. 1, 2, 3, 4 and 5 inhibited from 3.0±1.2% to 66.5±2.0% NDMA formation in the reaction system which was mixture of nitrite and dimethylamine.

Key words: kumquat, simulated gastric condition, phenolic portion, NDMA

N-nitrosamine(NA)은 전구물질인 아질산염과 아민이 식품의 상재 성분으로 널리 존재하고 있으므로 식품의 저장이나 가공 중 또는 위내에서 산 촉매반응에 의해 생성되기 쉽다. 생체내에서 NA의 형성은 특정 화합물에 의한 체내 2차적인 독성의 원인으로 지적되고 있으며,[1] 정상적인 위내 조건하에서 식이내 아민과 타액의 아질산염으로부터 NA의 생성은 잠재적인 발암원 형성의 주된 메카니즘으로 알려지고 있다.[2] 따라서 식사를 통한 NA 및 그 전구물질의 섭취는 인체의 NA 노출에 대한 주요 경로로 볼 수 있다. Shin 등[3]은 일상식사를 통해 섭취될 수 있는 NDMA의 함량은 0.6~2.34 μg/day/person이며, *in vitro*에서 이들 식사의 인공소화를 통해서 생체내에서 NDMA 생성량을 고려해 볼 때 최대 5.15 μg/day/person까지 도달할 수 있을 것으로 추정하였다.

식품을 섭취한 후 생체내에서 더 많은 NA가 생성될 수 있다는 것이 증명됨에 따라,[4] 과일 쥬스와 같은 복합물이나 비타민 C, 비타민 E 및 페놀 화합물과 같은 식이 성분은 니트로소화 반응을 억제할 수 있다고 밝혀져 있다.[5] 특히 페놀 화합물은 수산기의 위치와 수, 반응계의 pH, 기질의 농도 및 아질산염과의 농도비 등에 의해서 니트로소화를 촉진시키거나 억제시키는 물질로 알려져 있다. 즉 polyphenol 화합물 중 페놀, guaiacol 및 resorcinol은 니트로소화 반응을 촉진시키나, hydroquinone, catechol, caffeic acid, ferrulic acid 등은 NA 생성을 억제하는 것으로 보고되어 있다.[6,7] 따라서 NA 생성억제 메카니즘은 전구물질인 아질산염의 소거능력에 따라 좌우되는 것으로 밝혀지게 되었다.

금귤은 껍질을 벗기지 않고 씨를 제외한 모든 부분을 식용으로 하는 감귤류의 일종으로 국내에서는 샐러드 및 가공식품의 재료로 이용되고 있다. 전보[8,9]의 연구결과, 금귤은 아질산염 소거 및 NDMA 생성억제에 상당한 효과가 있는 것으로 판명되어, 본 실험에서는 금귤쥬스가 질산염 및 아민을 함유한 식이의 인공소화 및 금귤로부터 분리한 페놀 화합물이 NDMA 생성에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

금귤(*Fortunella mararita*, Kumquat)은 씨 부분만 제거하고, 착즙하여 원심분리한 상층액을 쥬스로 사용하였다. 인공소화용 식이는 Table 1에 나타낸 바와 같이 총 열량을 1인분량에 맞도록 조정하여 대조구, 질산염급원 함유식이, 아민급원 함유식이 및 질산염-아민급원 함유식이로 구성하여 제조한 다음 혼합·마쇄한 것을 분석용 시료로 사용하였다. 여기에 금귤쥬스를 각각 5 m*l* 및 10 m*l*로 첨가하고, Weng[10]의 방법에 따라 인공타액 및 위액을 차례로 가하여 37°C에

†Author to whom correspondence should be addressed.

Table 1. Composition of diets for simulated gastric digestion

Ingredient (g) \ Diet group	Control[a]	Nitrate rich diet[b]	Amine rich diet[c]	Nitrate-amine rich diet
Steamed rice	210	210	210	210
Bean sprout soup	200	200	200	200
Seasoned cucumber	70	-	70	-
Beef boiled in soysauce	60	60	-	-
Seasoned red octopus with soy sauce	-	-	50	50
Chinese cabbage kimchi	60	60	60	60
Lettuce	-	50	-	50
Soybean paste	-	10	-	10
Total energy (kcal)	665.6	665.2	657.4	657.0

[a] Cucumber and beef were accepted as control food (nitrate content; 0.2 mg/70 g cucumber, dimethylamine content; <0.1 mg/60 g beef)
[b] Lettuce was accepted as nitrate rich food (nitrate content; 8.9 mg/50 g lettuce)
[c] Dried red octopus was accepted as amine rich food (dimethylamine content; 4.2 mg/50 g red octopus)

서 2시간 동안 소화시킨 것을 인공소화용 시료로 하였다.

페놀 화합물의 분획

상기의 쥬스(50 m*l*)에 2 N-HCl을 첨가하여 pH 2.5로 조정한 후 원심분리한 상층액을 Seo와 Morr[11]의 방법에 따라 활성화된 C_{18} sep-pak cartridge(Waters Associates, Milifore, MA)에 통과시킨 후, sep-pak에 잔존하는 물질을 75% 메탄올로 용리시킨 것을 페놀 획분으로 하여 HPLC(Pharmacia LKB LCC 2252)로 페놀 화합물을 분리하였으며, HPLC의 조건으로 칼럼은 μBondapak C_{18}, 검출기는 254 nm에서 LKB VWM detector를 사용하였고, 이동상 용매로 2% acetic acid(A)와 40% acetonitrile(B)를 사용하여 처음 1분 동안 B를 10%로 유지시키고 최후 70분까지 80%가 되도록 grandient를 행하였으며, 유속은 1.0 m*l*/min로 하였다. 페놀 화합물의 분획은 retention time에 따라 5개의 획분으로 나누어 이동상 용매를 제거시킨 후, 각각 증류수로 최종부피를 5 m*l*로 하였다.

NA의 분석

Sung 등[12]의 방법에 따라 약 25 g의 시료를 수증기 증류하여 얻은 증류물을 dichloromethane으로 추출한 다음 질소가스로 농축하여 GC-TEA로 분석하였다. GC-TEA의 분석조건은 10% carbowax 20M/80-100 chromosorb WHP로 충전한 칼럼을 이용하였고, oven 온도는 130~180°C(5 °C/min), injection port 온도는 180°C, pyrolizer 온도는 550 °C, interface온도는 200°C, 압력은 1 mmHg, He가스의 유속은 25 m*l*/min으로 하였다.

NDMA 생성억제 효과

100 mM 아질산나트륨 용액 1 m*l*와 0.2 M citrate buffer (pH 2.5)로 조제한 200 mM dimethylamine용액 0.5 m*l*를 혼합한 반응용액에 소정농도의 시료를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 dichloromethane 1 m*l*를 가하여 반응용액 중의 NDMA를 추출한 후 GC-TEA로 분석하였다. 대조군은 시료대신 완충용액을 사용하였으며, peak의 백분율(%)로 대조군과 비교하여 NDMA 생성억제 효과를 나타내었다.

결과 및 고찰

식이의 인공소화시 금귤첨가가 NDMA 생성에 미치는 영향

Table 2는 대조구, 질산염급원, 아민급원 및 질산염-아민급원 함유식이를 구성하여 인공소화한 후 NDMA를 분석한 결과이다. 대조구 식이의 NDMA 함량은 2.5±0.8 μg/kg이었으며, 질산염급원 함유식이에서는 8.5±1.2 μg/kg으로 NDMA 함량이 가장 높았다. 각 식이에 금귤쥬스를 5 m*l* 및 10 m*l*로 첨가하여 인공소화시킨 결과는 Table 3과 같다. 대조구에서 NDMA 생성억제 효과는 각각 20.0±1.2%와 21.0±1.5%였으며, 질산염-아민급원 함유식이에서는 각각 2.0±1.0% 및 2.2±0.4%로 금귤쥬스의 첨가량에 따른 차이는 거의 없었다. Choi 등[13]은 340 mg/day의 질산염과 아민급원 함유식이에 녹차 및 매실추출물을 10 m*l* 이하로 첨가했을 때, 시료의 첨가량에 따른 NDMA 생성억제 효과의 차이가 작았으나, 10 m*l* 이상인 경우 시료 추출물의 첨가량에 비례적으로 NDMA 생성억제 효과를 나타내었다고 하였다. 질산염급원 및 아민급원 함유식이에 10 m*l*의 금귤쥬스를 첨가하여 인공소화한 결과, NDMA 생성억제 효과는 각각 54.8±3.1%, 69.4±2.4%으로 아민급원 함유식이에서 NDMA 생성억제 효과가 다소 높았다. 질산염급원 및 아민급원 함유식이는 각 식이에 존재하는 질산염과 아민 함량비율의 차이가 크기때

Table 2. The content of NDMA in experimental diets under simulated gastric digestion

Diet group	NDMA content (g/kg)*
Control	2.5±0.8
Nitrate rich diet	8.5±1.2
Amine rich diet	6.0±0.6
Nitrate-amine rich diet	8.0±1.5

*Values are mean±S.D (standard deviation) of three replicates/treatment

Table 3. Inhibition of NDMA formation in experimental diets added kumquat juice under simulated gastric digestion

		Inhibition rate of NDMA formation (%)*			
		Control	Nitrate rich diet	Amine rich diet	Nitrate-amine rich diet
Kumquat juice	5 ml	20.0±1.2	35.4±2.3	50.9±3.0	2.2±1.0
	10 ml	21.0±1.5	54.8±3.1	69.4±2.4	2.2±0.4

*Compared with each diet added by distilled water, which is 0% inhibition

Values are mean±S.D (standard deviation) of three replicates/treatment

문에 NDMA 생성반응 속도가 느리며, 또 아민급원 함유식이는 질산염의 함량이 상대적으로 낮으며, 또한 금귤쥬스에 의해 NDMA 생성반응 속도가 저하되므로써 NDMA 생성이 억제된 것이라 생각된다. 질산염-아민급원 함유식이는 대조구에 비해 많은 양의 질산염과 아민이 공존하기 때문에 인공소화 과정중 니트로소화 반응에서 질산염이 아질산염으로, 아질산염은 nitric oxide로 분해되어 잔존하는 아민과 재차 반응되었기 때문에 오히려 NDMA의 생성이 촉진되므로써 NDMA 생성억제 효과가 작았던 것으로 생각된다.

Shin 등[3]은 단체급식소에서 식단을 수거하여 인공소화 전·후의 NDMA 함량을 비교한 결과 인공소화한 후 NDMA의 함량은 0.43~0.80 μg/kg의 범위로 인공소화 전에 비해 약 1.1~2.2배 증가하였다고 보고하였다. Chung[14]은 아민급원 함유식이에 400 mg/day의 질산염을 첨가하여 인공소화시켰을 때 3.0 μg/kg의 NDMA가 생성되었는데 여기에 딸기, 마늘 및 케일쥬스를 가하여 인공소화하므로써 약 50% 정도의 NDMA 생성억제 효과를 나타내었다고 하였다. 사람의 타액에는 약 200 mg/l의 질산염이 함유되어 있으며, 구강 미생물의 형태와 양에 따라 섭취된 질산염의 20~25%정도가 아질산염으로 환원된다.[15] 따라서 사람의 위액 중 아질산염의 농도는 0.01~0.16 mM의 범위이며 음식물을 섭취한 후에는 0.3 mM까지 증가하는데,[16] 이러한 전환율을 고려해 볼 때 식이를 통한 아질산염의 섭취량은 20 μmol/day/person정도로 추정될 수 있다고 보고되어 있다.[17]

금귤쥬스로부터 분리한 페놀 화합물이 NDMA 생성에 미치는 영향

Fig. 1은 금귤쥬스로부터 분리한 페놀 획분의 HPLC chromatogram으로 총 20여종의 페놀 화합물이 분리되었으며, 이 중 5개의 분획을 회수하여 아질산염과 dimethylamine이 함유된 pH 2.5의 반응용액에 각각 1, 3 및 5 ml로 첨가하여 NDMA 생성억제 효과를 실험하였다(Table 4). Fraction no. 3, 4 및 5는 분획물의 첨가량에 따라 NDMA 생성억제 효과가 증가되어, fraction no. 4를 5 ml 첨가했을 때 NDMA 생성억제 효과는 66.5%로 나타났다. 반면에, fraction no. 1과 2의 NDMA 생성억제 효과는 10% 미만이었다. 각 분획물(fraction no. 1-5)은 여러 페놀 화합물의 혼합물로 존재하기 때문에 NDMA 생성억제 효과는 이들 페놀 화합물의 상호작용인 것으로 추측되며, retention time을 고려해 볼 때

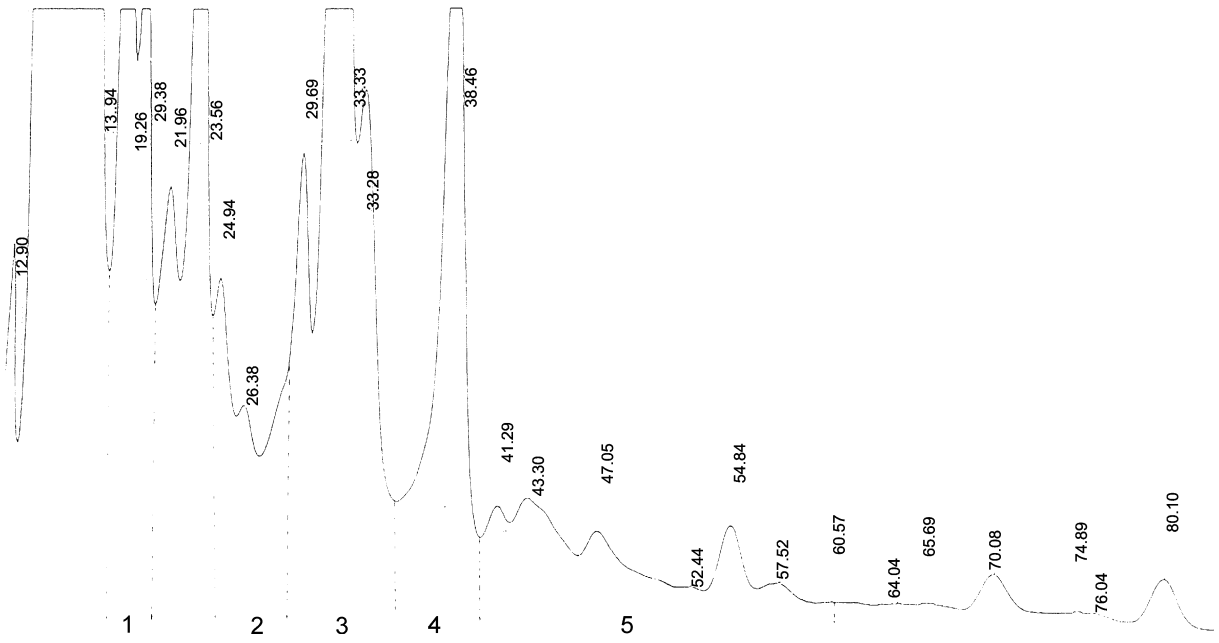

Fig. 1. HPLC chromatogram of phenolic portion from kumquat juice divided into 5 fractions.

Table 4. Inhibition of NDMA formation from the phenolic portion of kumquat juice by HPLC

Inhibition rate of NDMA formation (%)*

HPLC fraction no. (retention time, min) \ Added amount (ml)	1	3	5
fraction 1 (14 - 20)	3.0±1.2	3.5±1.3	3.3±1.1
fraction 2 (20 - 24)	5.2±2.1	3.8±1.4	3.0±1.2
fraction 3 (30 - 34)	10.7±1.5	18.5±2.0	19.9±1.0
fraction 4 (36 - 40)	21.4±1.6	47.0±2.2	66.5±2.0
fraction 5 (41 - 57)	25.9±2.3	27.3±1.3	30.6±1.5

*Values are mean±S.D (standard deviation) of three replicates/ treatment

30분 이후에 검출된 페놀 화합물에서 NDMA 생성억제 효과가 두드러지게 나타남을 알 수 있었다. Lee 등[18]은 케일로부터 HPLC를 이용하여 분획한 페놀 화합물에서 NDMA 생성억제 효과를 실험한 결과 fraction no. 2에서 50%이상의 NDMA 생성억제 효과가 나타났으며, 이 물질의 검출시간은 30~40분경이라고 하였다. Park[19]은 적치커리의 페놀 화합물을 HPLC로 분리하는 과정에서 30~50분경에 분획된 화합물에서 NDMA 생성억제 효과가 가장 낮았으며 50~80분경에 회수한 분획물에서 NDMA 생성억제 효과가 가장 높았다고 하여 본 실험과는 상반된 결과였다.

Nakamura와 Kawabata[20]는 일본 녹차에 존재하는 polyphenol 중 catechin은 NA의 생성을 촉진시키나, pyrocatechol, pyrogallol 및 gallic acid는 NA 생성을 저해한다고 하였으며, Bartsh 등[5]은 커피, 차 및 과일쥬스와 같은 식품에서 NA 생성을 저해시키는 주된 물질로 페놀 화합물을 보고한 바 있다.

이와 같이 페놀 화합물의 니트로소화반응 억제는 아민류와 반응할 수 있는 아질산염을 nitric oxide, nitrous oxide 및 nitrogen과 같은 무해한 물질로 전환시키는데, 이는 페놀 중 유리 수산기의 수에 좌우된다고 볼 수 있다.[21] 또한 페놀 화합물은 아질산염을 소거시키지 않고, 단지 아민과 아질산염으로부터 NA 생성반응을 방해함으로써 NDMA 생성억제 효과를 나타내는데, 이런 경우에 NDMA 생성억제 효과는 다소 감소되기도 한다.[22] 따라서 본 실험에서 금귤의 페놀 화합물은 종류가 다양하여 분획물에 따라 NDMA 생성억제 효과에 차이가 있었으나, 질산염 및 아민을 함유한 식이의 섭취시 체내에서 생성될 수 있는 NA의 감소에 변수로 작용할 수 있으리라 기대된다.

국문요약

대조구, 질산염급원, 아민급원 및 질산염-아민급원 함유식이에 인공타액과 위액을 첨가하여 인공소화시켰을 때 각 식이의 NDMA 함량은 각각 2.5±0.8 μg/kg, 8.5±1.2 μg/kg, 6.0±0.6 μg/kg 및 8.0±1.5 μg/kg이었다. 이들 식이에 금귤쥬스 10 ml를 첨가하여 인공소화시켰을 때 NDMA 생성억제 효과는 아민급원 함유식이에서 69.4±2.4%로 가장 높은 억제효과를 나타내었다. 금귤쥬스로부터 HPLC를 이용하여 분취한 페놀 화합물의 모든 분획에서 NDMA 생성억제 효과가 나타났으며, 특히 fraction no. 4에서 66.5±2.0%로 가장 높았다.

참고문헌

1. Barale, R., Zucconi, D. and Loprieno, N.: A mutagenicity methodology for assessing the formation of N-dimethylnitrosamine *in vivo*. *Mutation Research*., **85**, 57-70 (1981).
2. Tricker, A.R., Pfundstein, B., Kalble, T. and Preussmann R.: Secondary amine precursors to nitrosamines in human saliva, gastric juice, bloods, urine and faeces. *Carcinigenesis*, **13**, 563-658 (1992).
3. Shin, J.H., Kim, Y.H., Lee, S.J., Shon, M.Y. and Sung, N.J.: Assessment of estimated daily intakes of N-nitrosamine by diet. *Korean J. Food & Nutr.*, **15**, 29-35 (2002).
4. Ohshima, H. and Bartsch, H.: Quantitative estimation of endogenous nitrosation in humans by monitoring N-nitrosoproline excreted in the urine. *Cancer Res.*, **41**, 3658-3662 (1981).
5. Bartsh, H., Ohshima, H. and Pignatelli, B.: Inhibitors of endogenous nitrosation. Mechanism and implications in human cancer prevention. *Mut. Res.*, **202**, 307-324 (1988).
6. Cooney R.V. and Ross, P.D.: N-nitrosation and N-nitration of morpholine by nitrogen dioxide in aqueous solution; Effect of vanillin and related phenols. *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 789-793 (1987).
7. Kuenzig, W., Chau, J., Norkus, E., Holowaschenko, H.,

Newmark, H., Mergens, W. and Coonney, A.H.: Caffeic acid and ferulic acid as blockers of nitrosamine formation. *Carcinogenesis*, **5**, 309-313 (1984).
8. Song, M.H., Shin, J.H. and Sung, N.J.: The effect of citrus juice on nitrite scavenging and NDMA formation. *J. Inst. Agri. & Fishery Develop*. Gyeongsang Nat'l. Univ., **19**, 1-14 (2000).
9. Song, M.H., Lee, S.H., Shin, J.H., Choi, S.Y. and Sung, N.J.: Effect of the N-nitrosodimethylamine formation in ascorbate and phenolic portions from citrus juice. *Korean J. Food & Nutr.*, **15**, 97-103 (2002).
10. Weng, Y.M.: Nitrosamine formation and mutagenicity of Chinese style salted treated with nitrite under simulated gastric digestion. M.S. thesis, Cornell Univ. (1989).
11. Seo, M. and Morr, C.V.: Improved high performance liquid chromatographic analysis of acids and isoflavonoids from soybean protein products. *J. Agric. Food Chem*., **32**, 530-533 (1984).
12. Sung, N.J., Klausner, K.A. and Hotchkiss, J.H.: Influence of nitrate, ascorbic acid, and nitrate reductase microorganisms on N-nitrosamine formation during Korean-style soysauce fermentation. *Food Additives and Contaminants*, **8**, 291-298 (1991).
13. Choi, S.Y., Chung, M.J., Shin, J.H., Kim, H.J. and Sung, N.J.: Effect of green tea and maesil extracts on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine. *Korean J. Food & Nutr.*, **15**, 16-22 (2002).
14. Chung, M.J.: Effect of diet composition on endogenous formation of N-nitrosamine in humans. Ph. D thesis of Gyeongsang National Univ. (2001).
15. Wagner, D.A., Shultz, D.S., Deen, W.M., Young, V.R. and Tannenbaum, S.R.: Metabolic fate of an oral does of N-labeled nitrate in humans; effect of diet supplementation with ascorbic acid. *Cancer Res*., **43**, 1921-1925 (1983).
16. Walters, C.L., Dyke, C.S., Saxby, M.J. and Walker, R.: Nitrosation of food amines under stomach condition. In Environment N-nitroso compounds analysis formation. *IARC* Sci. Publ. **14**, 181-193 (1976).
17. Hotchkiss, J.H.: Relative exposure to nitrite, nitrate and N-nitroso compounds from endogenous sources. Food Toxicology, ed. (Taylor, S.L. and Scanlan, R.A. eds.) Marcel Dekker, New York, pp. 57-100 (1989).
18. Lee, S.J., Park, S.D., Chung, M.J., Shon, M.Y. and Sung, N.J.: Inhibitory effects of phenolic portion from kale extract on N-nitrosodimethylamine formation. *Food Sci. Biotechnol*., **11**, 252-256 (2002).
19. Park, S.D.: Identification and isolation of nitrosation inhibitor among components separated from extracts of red chichory, *Cichorium Intybus*. M.S. thesis of Gyeongsang National Univ. (1999).
20. Nakamura, M. and Kawabata, T.: Effect of Japanese green tea on nitrosamine formation *in vitro*. *J. Food Sci.*, **46**, 306-307 (1981).
21. Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D.: The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean J. Food Sci. Technol*., **28**, 232-239 (1996).
22. Lee, J.H.: Nitrite scavenging effect of some compounds and their influence on N-nitrosoproline formation, M.S. thesis of National Fisheries Univ. Pusan (1992).