食用 Azo 色素가 Hepatic Azo Reductase에 미치는 影響과 Flavin의 効果

윤혜정 · 원형란

이화여자대학교 약학대학

Influence of Food Dye on the Activity of Hepatic Azo Reductase and the Effect of Flavin

Hea-Chung Yun and Hyung-Ran Won

College of Pharmacy, Ewha Womans University

Seoul 120, *Korea*

ABSTRACT-With the market of food products, the use of food additives is on the increase. The dye as food additives, can be used for some foods which are difficult to preserve their own colors. It can be also classified as tar dye, vegetable dye and mineral dye. Because tar dye has dense toxicity, only 15 articles among them are legally allowed to be used.

Among the allowed articles, the azo compound amaranth, tartrazine, sunset yellow, and allura red, were used in determining and comparing rat hepatic azo reductase activity and we observed the flavin's effects as follows:

1. Investigation with amaranth as substrate gave an apparent Km of 645 μm and Vmax of 50 n mol/min/mg protein.

2. On investigation using a fixed amaranth concentration over a range of flavin concentration, FAD significantly increased the activity of the azo reductase compared with only minor increases in reaction mediated by the NADPH-generating system alone.

3. On investigation with amaranth, tartrazine, sunset yellow allura red as electron acceptor in the absence or presence of 300 mM-FAD, sunset yellow was reduced at a rat similar to amaranth, tartrazine was reduced at a slower rate and allura red was reduced a little more rapidly.

Keywords □ Azo dyes, Amaranth, Tartrazine, Sunset yellow, Allura red, Hepatic azo reductase, Flavin.

식품의 제조 및 가공 기술이 발달함에 따라 식품의 종류와 형태가 점점 다양화하는 한편, 식생활의 향상에 따른 보존식품, 가공식품, 인스턴트식품의 이용도가 늘어감에 따라 식품첨가물의 수도 점차 증가하는 추세에 있다[1,2].

현재 사용이 허가된 tar 색소 중 azo 화합물인 amaranth[3-7], tartrazine, sunset yellow[8], allura red는 비록 독성이 없는 것으로 알려져 있지만 구조상 연관이 있는 많은 다른 azo 화합물의 발암 작용이 밝혀져 있으며[9] 실제로 carcinogenic azo dye로 처리한 쥐에 있어서, necrosis를 일으키는 hepatotoxic substance 투여의 경우와 유사한 endoplasmic reticulum의 변화가 일어났다는 보고가 있다[10]. 또한 장기간에 걸쳐서 축적된 만성 독성으로 기형을 유발한다는 보고도 있다[11].

간 microsome에 존재하는 약물대사효소는 의

Received for publication 2 March; 1987
Reprint requests; Dr. H.C. Yun at the above address

약품 등 여러 외인성 물질들을 대사시키는 한편[12,13], 이 물질들에 의하여 활성이 변화됨으로써 약물의 치료효과 및 독성발현에 많은 영향을 주기도 한다. 이러한 약물대사효소는 의약품, 살충제, 발암성 물질 등과 식품첨가물 등에 의해서 활성이 억제 또는 유도된다는 사실이 이미 많은 학자들에 의해 밝혀져 있다[14,15].

몇몇 방향족 azo 화합물은 포유류의 간 microsomal fraction에 존재하는 NADPH-dependent enzyme에 의해 1급 amine으로 환원적으로 분해된다고 보고된 바 있다[16,17].

이보다 앞선 연구에서 flavoprotein NADPH-cytochrome C(P-450) reductase가 azo reductase activity를 나타낸다고 제시된 바 있으며[18,19], 계속된 연구에서는 NADPH-cytochrome C(P-450) reductase와 cytochrome P-450에 의한 환원과 일치하는 2개의 경로가 제시되었다[20,21]. 보다 최근의 연구에서는 amaranth의 환원이 cytochrome P-450에 의존한다는 사실이 밝혀졌다[22,23].

Microsomal fraction의 azo reductase activity는 riboflavin, flavin mono nucleotide (FMN), flavin adenine dinucleotide(FAD)에 의해 증가되는데[18,24,25], 이것은 수용성 flavin이 electron carrier로 작용하여 azo reductase enzyme으로부터 azo substrate로 전자를 전달하기 때문이라고 알려져 있다[19].

한편, 쥐에 경구투여한 azo 색소가 간, 신장 순으로 축적된다는 보고가 있어[26] 본 실험에서는 간의 대사과정중 azo 색소의 환원작용을 검색하고 이들의 환원작용에 미치는 flavin의 효과를 연구하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물—실험동물로 체중 160g 전후의 웅성 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 1주일 이상 동물실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

시약—본 실험에 사용한 Bovine serum albumin fr.V, Glucose-6-phosphate, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Glucose oxidase 및 FAD는 sigma社에서, Catalase, NADP는 BDH社에서 그리고 Amaranth, Tartrazine, Sunset yellow, Allura red는 남영상사주식회사(일본 후생성검정품)에서 각각 구입하였으며 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

간 효소액의 분리—실험전 24시간 동안 절식시킨 흰 쥐의 간을 적출하여 얼음으로 냉각시킨 0.25 M-sucrose, 1 mM EDTA, 1.15% KCl을 함유한 pH 7.4, 50 mM-sodium phosphate buffer(sodium phosphate buffer) 50 m*l*로 씻고 평량하였다. Homogenizer tube에 간을 넣고 25 m*l*의 sodium phosphate buffer를 넣은 후 얼음으로 냉각시키며 homogenize한 후 0℃~4℃에서 20분간 10,000×g로 원심분리하여 그 상등액을 효소액으로 사용하였다. 효소액은 실험 당일에 제조하였다.

Protein의 정량—Protein의 정량은 Lowry법에 따랐다[27].

Hepatic azo-reductase 활성 측정—효소액 1 m*l*를 scheme 1과 같이 처리한 후 흡광도를 측정하고 소실된 기질의 양을 표준 검량선에 의해 계산하여 azo reductase activity를 소실된 기질의 m mol/min/mg protein으로 표시하였다.

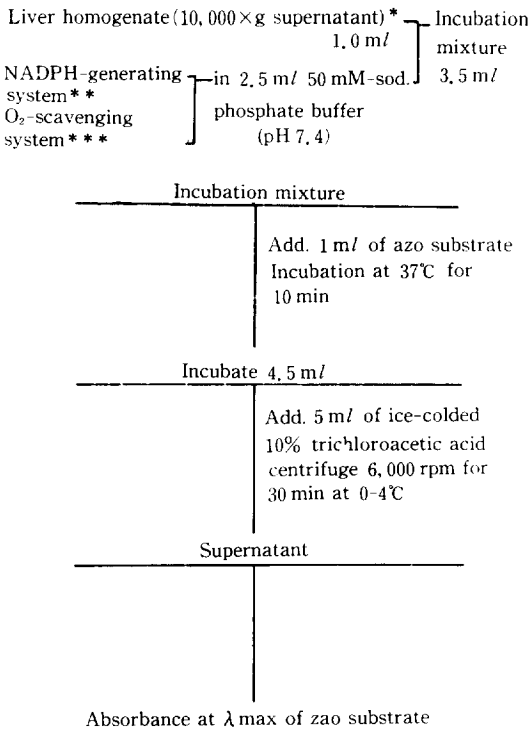
결과 및 고찰

Amaranth 농도변화에 따른 hepatic azo reductase의 활성 측정—Amaranth의 농도가 12.5 μM, 25 μM, 37.5 μM, 50 μM, 62.5 μM, 75 μM일때 azo reductase 활성을 측정하였다(Table 1).

이것을 Lineweaver-Burk plot을 하여 $\frac{1}{Vmax}$을 절편으로 하고 $\frac{Km}{Vmax}$을 방향계수로 하는 직선을 얻어 외삽에 의해 Km과 Vmax를 구했다.

그 결과 Km=645 μM, Vmax=50 n mol/min/mg protein의 값을 얻었다. 본 실험에서 Mallett[28]의 결과보다 Michaelis 상수 Km이 크게 나타난 것은 incubation하는 동안 산소를 완벽하게 제거해 주지 못하여 효소의 기질에 대한 친화력이 떨어졌기 때문이라고 생각된다.

Amaranth에 대한 hepatic azo reductase의 활성에 미치는 flavin의 효과—Amaranth의 농도는



Schem 1. Assay procedure of hepatic azo reductase.

* contains 0.5~1.0 mg of protein/ml
** $NADP^+$ 0.5 mM
G-6-P 6 mM G-6-P DH 1 unit/ml
*** Glucose 60 mM
G-Oxidase 10 unit/ml
Catalase 300 unit/ml

Table 1. Effect of Amaranth concentration on the activity of hepatic azo reductase.

Amaranth concentration (μM)	Azo reductase activity (n mol/min/mg protein)
12.5	0.9536 ± 0.0021*
25	1.8430 ± 0.0220
37.5	2.8646 ± 0.0734
50	3.9492 ± 0.1298
62.5	4.6108 ± 0.5502
75	4.9810 ± 0.3498

※ mean±S.D of triplicate determinations

75 μM로 일정하게 하고 FAD의 농도를 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM으로 증가시켰을 때 나타나는 azo reductase 활성을 측정하였다. 또한 NADPH-generating system에 의한 영향을 보기 위하여 효소액 대신 sodium phosphate buffer를 가하고 위와 같이 azo reductase 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 2).

Fujta 등은 flavin에 의한 azo reductase의 활성의 증가는

① Apoflavoprotein+flavin → holoflavoprotein+NADPH → RN=NR′

② NADPH → NADPH-Cyt. P-450 reductase → flavin → cyt. P-450→ RN=NR′

③ NADPH → NADPH-Cyt. P-450 reductase → Cyt. P-450→ flavin → RN=NR′

④ NADPH → Non-Cyt. P-450 microsomal components→flavin→RN=NR′

중 어느 하나이거나, 하나 이상의 전자 전달 기전에 의한 것이라 예상하였는데[29] 앞으로 더욱 규명하여야 한다고 생각한다. FAD의 농도가 증가할수록 azo reductase의 활성은 현저히 증가하였으나 NADPH-generating system만에 의한 환원은 작은 증가를 나타냈는데 이것은 Mallett의 결과와 일치한다[28].

NADPH는 간의 약물대사효소 작용의 Cofactor로 알려져 있다[30]. 본 실험에서는 NADPH-generating system으로서 NADP, yeast glucose 6-phosphate dehydrogenase, G-6-P를 사용하였다[31].

기타 식용 azo 색소에 대한 hepatic azo reductase의 활성과 이에 미치는 flavin의 효과—Tartrazine, sunset yellow, allura red의 농도를 75 μM로 일정하게 하여 azo reductase 활성을 측정하고, 또 각각에 300 μM-FAD를 첨가한 후 azo reductase 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다(Table 3).

AZO 색소의 구조와 rat hepatic azo reductase 활성과의 관계는 지용성 색소보다 수용성 색소가 더 빨리 환원되고, 방향족환에 전자 흡인기가 있으면 더욱 빠르게 환원된다[32]. Larsen 등[33]에 의하면 sulphonate group의 수가 각각 다른 수용성 색소에서의 환원속도는 sulphonate group의 위치보다 수에 의존한다고 한다. 또한 azo bond 주위의 naphthalene은 steric hindrance를 주기때문에 phenyl ring보다 환원이

Table 2. Influence of added FAD on the activity of hepatic azo reductase.

	Amararth conc. (μM)	FAD concentration (μM)	Azo reductase activity (n mol/min/mg protein)	Increase rate (%)
Enzyme	75	0	4.9810 ± 0.3498**	100
solution		100	5.9459 ± 0.0367*	119.37
+ NADPH-		200	6.1371 ± 0.0302*	123.21
generating		300	6.2597 ± 0.0139*	125.67
system		400	6.3773 ± 0.0139*	128.03
			6.4558 ± 0.0120*	
NADPH-gen-	75	0	3.5508 ± 0.0166	100
erating		100	3.5633 ± 0.0454*	100.35
system		200	3.6957 ± 0.0386*	104.08
		300	3.8427 ± 0.0184*	108.22
		400	3.9359 ± 0.0250**	110.85
		500	4.0437 ± 0.0481**	113.88

※ mean±S.D of triplicated determinations.
Different from the control; *$p<0.05$, **$p<0.001$

Table 3. Comparison of azo substrate as electron acceptors during hepatic azo reduction, in the absence or presence of 300 μM-FAD.

Azo substrates	Azo reductase activity (n mol/min/mg protein)		
	Non-FAD-supplemented	FAD-supplemented	Increase rate (%)
Amaranth	4.9810 ± 0.3498*	6.2597 ± 0.0139*	125.67
Tartrzine	2.2091 ± 0.0376	2.8551 ± 0.3586*	129.24
Sunset yellow	4.0214 ± 0.3764	5.3364 ± 0.6805*	132.70
Allura red	6.0561 ± 0.0193	8.7726 ± 0.5409**	144.86

※ mean±S.D of triplicate determinations.
Different from the control; *$p<0.05$, **$p<0.001$

어렵게 된다[32]. 본 실험에서 allura red의 환원속도가 amaranth의 환원속도보다 빠른 것은 amaranth가 2개의 naphthalene 핵을 가져 steric hindrance를 더 많이 받기 때문이라 생각되며, sulfonate group이 2개인 sunset yellow보다 3개인 amaranth가 더 빨리 환원되었는데 이는 Watabe 등[34]의 결과와 일치한다. 또한 Tartrazine의 환원속도가 가장 느린 것은 분자내 수소결합으로 안정화되기 때문이라 생각된다[34].

결 론

식용 azo 색소가 hepatic azo reductase에 미치는 영향과 이에 대한 flavin의 효과를 보기 위해 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐의 간을 적출하여 hepatic azo reductase 활성을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Amaranth의 농도가 12.5 μM, 25 μM, 37.5 μM, 50 μM, 62.5 μM, 75 μM일 때 azo reductase 활성을 측정한 결과 낮은 농도에서는 효소반응의 속도가 기질농도에서 비례하고, 효소농도에 비하여 기질농도가 증가하면 효소반응의 속도가 일정하게 되는 것을 알 수 있었다.

2. Amaranth의 농도는 75 μM로 일정하게 하고 FAD의 농도를 100 μM, 200 μM, 300 μM, 400 μM, 500 μM으로 증가시켰을 때 나타

나는 azo reductase 활성을 측정한 결과 flavin의 농도가 증가할수록 azo reductase의 활성도 현저히 증가하는 것을 알 수 있었다.

한편 NADPH-generating system에 의한 환원에 미치는 flavin의 효과를 보기위하여 효소액 대신 sodium phosphate buffer를 가하고 위와 같이 측정한 결과 flavin의 농도가 증가할수록 NADPH-generating system에 의한 환원도 증가하나 hepatic azo reductase 활성 증가에 비하여 작은 증가를 나타냈다.

3. Tartrazine, sunset yellow, allura red의 농도를 75 μM로 일정하게 하고 azo reductase 활성을 측정한 결과 sunset yellow는 amaranth와 비슷한 환원활성을 나타냈으며, tartrazine은 보다 낮은 환원활성을 나타냈고, allura red는 보다 높은 환원활성을 나타냈다. 이에 300 μM-FAD를 첨가하여 azo reductase 활성을 측정한 결과 기질 모두에서 활성이 증가함을 알 수 있었다.

국문 요약

식품의 상품화에 따라 식품 첨가물의 사용이 증가되고 있다. 식품 첨가물로서 색소는 식품 고유의 색소를 보존하기 어려운 식품에 사용되며 tar 색소, 식물성 색소 및 광물성 색소로 나눌 수 있는데 tar 색소는 독성이 강한 것이 많으므로 현재 15종만이 법적으로 허용되어 있다.

이중 azo 화합물인 amaranth, tartrazine, sunset yellow, allura red에 대하여 흰 쥐의 hepatic azo reductase의 활성을 측정 비교하였고 이에 대한 flavin의 효과를 보았다.

1. Amaranth를 기질로 사용하여 kinetic constants Km=645 μM, Vmax=50 n mol/min/mg protein의 값을 얻었다.

2. Amaranth의 농도를 일정하게 하고 FAD의 농도를 증가시켰을 때 hepatic azo reductase의 활성은 현저히 증가하였으나 NADPH-generating system에 의한 환원은 작은 증가를 나타냈다.

3. 기타 식용 azo 색소 tartrazine, sunset yellow, allura red를 기질로 azo reductase activity를 측정한 결과 sunset yellow는 amaranth와 비슷한 환원활성을 나타냈고, tartrazine은 보다 낮은 환원활성을 allura red는 보다 높은 환원활성을 나타냈으며, 300 μM-FAD에 의해 기질 모두에서 환원활성이 증가함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. 權龐杓, 禹世鴻, 「食品衛生學」(서울 ; 開文社), pp.320-330(1977).
2. 張智鉉, 金敎昌, 「食品衛生學」(서울 ; 修學社), pp.214-215(1984).
3. Keplinger, M.L., Wright, P.L., Plank, J.B. and Calandra, J.C. *Toxicology* and *Applied Pharmacology* **28**, 209-215(1974).
4. Khera, K.S., Roberts, G., Trivett, G., Terry Geraldine and Whaler Carole *Toxicology* and *Applied Pharmacology* **38**, 389-398(1976).
5. Drake, J.J.P., Bibra *Int. Flavors Food Addit.* **6**(2), 116(1975).
6. Thomas F.X. Collins, Hellyn V. Keeler, Thomas N. Black and Dennisi Ruggles *Toxicology* **3**, 115-128(1975).
7. Sune Larsson, K. *Toxicology* **4**, 75-82(1975).
8. Mannell, W.A. Grice, H.C., Lu, F.C. and Allmark, M.G., *J. Pharm. Pharmac.* **10**, 625(1958).
9. John Doull and Curtis O. Klassen, Casarett and Doull's Toxicology;The Basic Science of Poison 2nd ed. New York: Macmillian Publishing Co., Inc.(1975).
10. Smuckler, E.A., Iseri, O.A. and Benditt, E.P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **5**, 270-275(1961).
11. Magee, P.N. *Lab. Invest.* **15**, 111-131(1966).
12. Sidney D. Nelson, Burger's Medicinal Chemistry, **4**, 227-268(1980).
13. Anders, M.W. *Ann. Rev. Pharmacol.* **11**, 37-56(1971).
14. Woo, W.S., Shin, K.H., Kim, I.C. and Lee, C. K. *Arch. Pharm. Res.* 1(1), 13-19(1978).

15. Conney, A.H. *Pharmacol. Rev.* **19**, 317-365(1967).
16. Gillette, J.R. *Handb. Exp. Pharmacol.* **28**, 349-361(1971).
17. Mason, R.P., Peterson, F.J. and Holtzman, J. L. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **75**, 532-540(1977).
18. Mueller, G.C. and Miller, J.A. *J. Biol. Chem.* **185**, 145-154(1950).
19. Fout, J.R., Kamm, J.J. and Brodie, B.B. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **120**, 291-300(1957).
20. Hernandez, P.H., Gillette, J.R. and Mazel, P. *Biochem. Pharmacol.* **16**, 1859-1875(1967a).
21. Hernandez, P.H., Mazel, P. and Gillette, J.R. *Biochem. Pharmacol.* **16**, 1877-1888(1967b).
22. Fujita, S. and Peisach, J. *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **36**, 3695(1977).
23. Autrup, H., Tharlon, B.J. and Warwick, G. P., *Biochem. Pharmacol.* 23, 2341-2345(1974).
24. Williams, J.R., Grantham, P.H., Yamamoto, R.S. and Weisburger, J.H. *Biochem. Pharmacol.* **19**, 2523-2525(1970).
25. Mallett, A.K., King, L.J. and Walker, R. *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 1522-1524(1977).
26. 浦久保五郎, 食衛誌 8(6), 489-493(1967).
27. Oliver H. Lowry, Nira J. Rosebrough, A. Lewis Farr and Rose J. Randall *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275(1951).
28. Anthony K. Mallett, Laurence J. King and Ronald Walker *Biochem. J.* 201, 589-595(1982).
29. Shoichi Fujita and Jack Peisach *Biochimica et Biophysica* **719**, 178-189(1982).
30. Brodie, B.B., Gillette, J.R. and La Du, B.N. *Ann. Rev. Biochem.* **27**, 427-454(1958).
31. Gram, T.E. and James R. Fouts *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **158**, 317-322(1967).
32. Leon Shargel, AliR. Banijamali, Simon H. Kuttab *Journal of Pharmaceutical Science* 73(2), 161-164(1984).
33. Larsen, J.C., Meyer, T. and Scheline, R.R. *Acta. Pharmac. tox.* **38**, 353(1976).
34. Watabe, T., Ozawa, N. and Kobayashi, F. *Food Cosmet. Toxicol.* **18**, 349-352(1979).