

## Paraquat 유독성에 대한 Flavonoid류의 독성경감효과

최 병 기 · 조 내 규

동덕여자대학교 약학대학

### Scavenging Effects of Flavonoids on Paraquat Induced Toxicity

Byung-Ki Choi and Nai-Kyu Cho

*College of Pharmacy, Dongduck Women's University*

#### ABSTRACT

To investigate and evaluate the scavenging and antioxidative effects of various flavonoids on paraquat induced toxicity, in vivo and vitro tests of eight flavonoids (catechin, epicatechin, flavone, chrysin, apigenin, quercetin, morin and biochanin A) were carried out.

The generation of reactive oxygen substances(ROS) in PMS-NADH system  $H_2O_2$  induced hemolysis and lipidperoxidation to blood, NADPH dependent lipidperoxidation to liver and lung microsome by paraquat were studied.

The results are summarized as follows:

- 1) In the concentration ranges from 3.3 to 9.8  $\mu M$  of catechin, epicatechin, quercetin and biochanin A removed the 50% of DPPH radical scavenging effects.
- 2) In the concentration ranges from 0.60 to 1.86 mM of catechin, epicatechin, quercetin and biochanin A showed the inhibitory and antioxidative activity on superoxide anion which generated in PMA-NADH system.
- 3) In the concentration ranges from 0.12 to 0.49 mM of catechin, epicatechin, quercetin and biochanin A showed the inhibitory and antioxidative activity on  $H_2O_2$  which generated in PMA-NADH system.
- 4) In the concentration ranges from  $0.6 \times 10^{-5}$  to  $6.3 \times 10^{-6}$  mM of catechin, epicatechin, flavone, chrysin, quercetin and morin showed the inhibitory and antioxidative activity on  $H_2O_2$  induced hemolysis to blood
- 5) All flavonoids tested exhibited inhibitory and antioxidative effects on paraquat induced liver and lung microsomal lipidperoxidation.

Therefore, all flavonoids evaluated showed the useful compounds for scavenger and antioxidant on paraquat induced toxicity.

서 론

Paraquat(1, 1-dimethyl 4, 4-dipyridium dichloride)는 국내에서 가장 반응되는 비 선택적 접촉 및 속효성 제초제로써 식물, 세균 및 동물에 대한 독성 작용과 기전이 광범위하게 연구 되어 있다.<sup>11-13)</sup>

Paraquat의 일반 독성기전은 생체내에서 NADPH 의존성 cytochrome P-450 reductase 및 xanthine oxidase와 관련된 redox cycle에 의해 생성된 Paraquat radical이 생성되고 이로 인한 지질과산화에 의한 세포막손상, hyaluronic acid의 depolymerization, 단백질의 불활성화, DNA의 손상 및 DNPH의 수소탈리에 의한 지방산 생합성의 저해 등이 일어난다.<sup>6)-12)</sup>

또한 세포내 NADPH의 감소로 환원형 glutathion의 감소가 일어나 지질과 산화를 촉진하여 장애를 일으킨다.<sup>12)</sup>

실험동물과 사람에 대한 Paraquat 독성의 일차적인 표적장기는 폐이며 그 외에 간, 신장 및 위장관의 장애를 일으키는 것으로 밝혀져 있으며, 특히 Paraquat 유도 폐독성일 때에는 출혈, 폐수종이 일어나고, 또한 생체내에 축적된 Paraquat는 연속적으로

활성산소를 생성하여 상기에서 언급한 일반독성기전에 의해 조직을 장해하며 중독적으로 폐섬유화(fibrosis)를 일으켜 사망으로 진전하기도 한다.<sup>13)</sup>

Paraquat는 현재 세계적으로 가장 빈용하는 제초제로 생산, 유통, 분배, 취급 및 사용에 있어 의도 및 비의도적인 사고에 의해 중독되었을 때 효과적인 치료법과 치료제가 없는 실정이다. 일반적으로 빈용되는 치료법과 치료제로서는 위장관 내의 Paraquat를 흡착 제거하기 위해 흡착제 fuller's earth, bentonite 및 활성탄 등의 투여와 함께 순환에 의해 흡수되는 Paraquat를 제거하기 위해 haemoperfusion 및 heamodialysis 등과 강제이뇨를 시행한다.

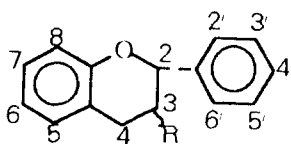
또한 기타 치료제로서 corticosteroid제, 면역억제제, 비타민제,  $\beta$ -blocking 및 alkylating제,  $\alpha$ -tocopherol, superoxide dismutase(SOD) 또는 glutathione peroxidase 등을 사용하나 Paraquat 중독에는 충분한 경감효과가 없다.

위와 같은 이유로 Paraquat의 독성경감제의 개발이 절실히 요구된다.

Flavonoid는 식물계의 가장 풍부하게 존재하는 물질로 항균작용, 항진균작용, 항바이러스작용, 항간독성작용, 항변이작용, 항염증작용, 항알러지작용 및

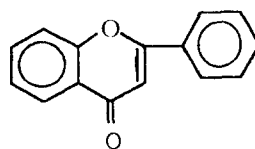
Table 1. chemical Structures of Flavonoid Derivatives.

	1	2	3	4	5	6	7	8	2'	3'	4'	5'	6'
Flavan-3-ol													
Epicatechin	NO	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	H	H
Catechin	NO	-	OH	H	OH	H	OH	H	H	OH	H	H	H
Flavanone													
Flavone	YES	-	H	-	OH	H	OH	H	H	H	H	H	H
Chrysin	YES	-	H	-	OH	H	H	H	H	H	H	H	H
Apigenin	YES	-	H	-	OH	H	H	H	H	H	OH	H	H
Flavonol													
Quercetin	YES	-	OH	-	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	H
Morin	YES	-	OH	-	OH	H	OH	H	OH	H	OH	H	H
Isoflavone													
Biochanin A	YES	H	-	-	OH	H	OH	H	H	H	R <sub>1</sub>	H	H

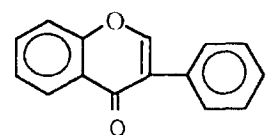


FLAVAN-3-OL

R<sub>1</sub>=-COOCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>



FLAVANONE  
FLAVONE  
FLAVONOL



ISOFLAVONE

항산화작용 등과 같은 다양한 생물학적 및 약리학적 활성을 갖고 있으며 이들 작용 가운데 flavonoid의 항염증작용은 생약중의 항염증 물질의 성분검색 뿐만 아니라 새로운 종류의 항염증 물질을 개발하기 위해 계속적으로 연구 및 평가되어 왔으나 아직도 기전 등 많은 부분이 알려져 있지 않다.<sup>14)15)</sup>

본 연구는 Paraquat에 유도된 독성 Paraquat의 redox cycle에 의해 생성된 활성산소(reactive oxygen species, ROS)로 인해 지질과산화 및 염증반응으로 간, 신장, 폐 및 적혈구의 세포손상을 야기한다는 점에서 구조활성 상관성을 고려하여 항산화작용과 항염증작용이 기대되는 flavonoid 8종(Table 1)을 가지고 활성산소발생계, Paraquat의 독성기전에 관련된 NADPH 의존성 cytochrome P-450 reductase 및 redox cycle에 의해 생성된 NADPH의 존성 지질과산화 억제 및 항산화작용을 검토한 결과 Paraquat 독성경감제의 유용성에 대한 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물

체중 25~30g의 숫컷 IRC계 마우스를 국립보건안전연구원에서 분양받아 사용했다.

#### 2) 시료 및 시약

Catechin, Epicatechin, Flavone, Chrysin, Apigenin, Quercetin, Morin, Biochanin A, 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazin, phenazine methosulfate, nitroblue tetrazolium, NADH, NADPH, 4-aminoantipyrine, horseradish peroxidase, paraquat(methyl viologe), thiobarbituric acid 미국의 Sigma 회사제를 사용했다.

### 2. 실험방법

#### 1) 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazine(DPPH) radical의 제거능 측정

시료의 메탄올용액에 DPPH( $1.5 \times 10^{-4}$  M)의 메탄올 용액 1ml를 가하고 반응액(전체 5ml)을 격렬하게 진탕하여 공기 중의 실온에서 30분간 방치한 다음 520nm에서 DPPH의 잔류량(잔류색조)를 측정하였다. IC<sub>50</sub>(50%감소)의 농도( $\mu$ M)는 DPPH의 잔류량

(%) 및 공시험 DPPH의 양(100%)에서 구하였다.

#### 2) Phenazine methosulfate(PMS)-NADH의 superoxide anion(SO)발생계를 사용한 nitroblue tetrazolium(NBT)환원법에 의한 SO의 측정

6.0mM NBT용액 0.3ml, 7.5mM NADH용액 0.2ml, 1.6mM PMS용액 0.1ml, 0.1mM 인산완충액(pH 7.5) 1.5ml, 시료, DMSO용액 30 $\mu$ l 및 정제수 0.9ml를 가해 진탕 혼화한 후 37°C에서 10분간 incubation하여 585nm에서 흡광도를 측정하였다.

공시험액으로서 1.6mM PMS 대신에 정제수를 사용하였다. diformazan의 분자흡광계수( $1.6 \times 10^{-4}$  M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)을 사용하여 흡광도에서 difornaxan양을 산출하여 이것을 SO의 생성량으로 하였다.

#### 3) PMS-NADH계에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정

Minotti 등<sup>16)</sup>의 방법을 응용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 측정하였다. 0.1mM인산완충액(1.5ml)에 7.5mM NADH 수용액 0.2ml, 정제수 1.2ml, 시료 DMSO용액 30 $\mu$ l 및 1.6mM PMS 수용액 0.1ml를 가하여 진탕 혼화한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 다음에 20mM EDTA 0.2ml, 50mM phenol수용액 0.3ml, 10mM 4-aminoantipyrine수용액 0.3ml 및 40units/ml horseradish peroxidase 수용액 0.2ml를 가하여 진탕한 후에 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 별도로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 표준액을 사용하여 동일하게 조작하여 검량선을 작성하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 구하였다.

#### 4) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 유도 용혈작용 및 지질과산화의 측정

Otomo 등<sup>17)</sup>의 개량법에 의해 측정하였다. DMF 0.2ml에 용해한 시료용액, 흰쥐의 적혈구( $2 \times 10^8$  cell) 및 146mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 Dulbecco의 인산완충 생리식염수액 [PBS(-), pH 7.2]을 가하여 2ml로 하고 이 반응액을 37°C에서 30분간 incubation한 다음 빙수중에서 반응을 정지시키고 1,700g에서 5분간 원심분리하여 상정액을 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) NADP의존성 지질과산화의 측정

1mg protein/ml microsome용액 1.0ml 50mM Tris-HCL완충액(pH 7.5) 0.4ml, 30mM ADP수용액 0.2ml, 1.5mM FwCl<sub>3</sub>수용액 0.2ml 및 시료용액 10 $\mu$ l를 진탕 혼화한 다음 37°C에서 10분간 incubation하였다. 다음에 5mM NADPH용액

(0.2ml)을 가하여 진탕 혼화하고 37°C에서 60분간 incubation하였다.

Thiobarbituric acid(TBA)측정; 반응용액에 2% BHT용액 0.2ml, 40mM EDTA용액 0.2ml 및 TBA시약 7.6ml을 가하여 진탕혼화하고 밀전하여 비등수욕상에서 30분간 가열한 다음 냉각후 여과하고 532nm에서 흡광도를 측정한다. Malondialdehyde(MDA)의 분자흡광계수( $1.56 \times 10^5 \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )를 사용하여 흡광도에서 MDA양을 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. DPPH radical에 대한 radical제거효과

Radical scavenger로써 flavonoid가 효과가 있는지 여부를 검색하기 위해 안정한 radical제인 DPPH를 가지고 flavonoid의 첨가에 따른 DPPH의 퇴색도를 비색법으로 측정하여 그 결과를 Table 2에 제시하였다.

본 실험방법의 안정성을 보기 위해 DPPH의 80 $\mu$ g/ml메탄올액을 비색법으로 520nm에서 경시변화를 측정한 결과 60분이상 매우 안정하였다.

실험결과에 의하면 flavan-3-ol구조의 catechin 및 epicatechin, flavonol구조의 quercetin과 isoflavone구조의 biochanin A는 DPPH radical에 대해 3.3~9.8 $\mu$ M 농도에서 radical scavenging effect를 나타내었으나 flavanone구조의 flavone, chrysin 및 apigenin과 flavonol 구조중 morin은 효과가 없었다.

### 2. Superoxide anion의 생성 억제작용 및 항산화 효과

PMS-NADH계에서 생성된 superoxid anion의 활성산소종을 정량하고 flavonoid를 가하여 Superoxide anion의 생성억제 및 항산화작용을 검토하여 그 결과를 Table 3에 제시하였다.

NBT법에 의해 PMS 및 NADH계에서 생성하는 superoxide anion의 측정값은 0.35mM이었으며, flavone, chrysin 및 morin을 제외한 5종의 flavonoid가 0.60~1.863mM에서 superoxide anion에 대한 생성억제작용과 항산화작용을 나타내었고 이중 biochanin A이 0.60mM농도에서 현저한 효과를 나타내었다.

**Table 2.** Radical Savenging Effects of Various Flavonoids on DPPH Radical.

Flavonoids	50%Reduction* ( $\mu$ M)
Catechin	6.9
Epicatechin	3.5
Flavone	-
Chrysin	-
Apigenin	-
Quercetin	3.3
Morin	-
BiochaninA	9.8

a) Amount required for 50% reduction of DPPH after 30mins.

**Table 3.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on the Formation of Superoxide Anion in PMS-NADH System(I).

Flavonoids	IC <sub>50</sub> (mM)
Catechin	1.86
Epicatechin	0.80
Flavone	-
Chrysin	-
Apigenin	1.38
Quercetin	0.08
Morin	-
BiochaninA	0.60

\* Reaction mixture contained 1.6mM PMS, 7.5mM NADH and 140mM DMSO in 0.1mM phosphate buffer(pH 7.5) at 37°C for 10mins.

**Table 4.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on Formation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PMS-NADH system(II).

Flavonoids	IC <sub>50</sub> (mM)
Catechin	0.49
Epicatechin	0.12
Flavone	0.22
Chrysin	0.26
Apigenin	-
Quercetin	0.07
Morin	0.06
BiochaninA	-

\* Reaction mixture contained 1.6mM PMS, 7.5mM NADH and 140mM DMSO in 0.1mM Phosphate buffer(pH 7.5) at 37°C for 0mins.

**3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성억제작용과 항산화효과**

PMS-NADH 계에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 활성산소종을 정량하고 flavonoid를 가하였을 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성억제 및 항산화작용을 검토하여 그 결과를 Table 4에 제시하였다.

Horseradish peroxidase법에 의해 PMS, NADH, DMSO 및 인산완충액(pH 7.5)계에서 생성하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 측정치는 0.473mM이 었고, flavonoid에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성억제작용은 50%의 억제농도 IC<sub>50</sub>(mM)로 표시하였다.

실험결과에 의하면 Apigenin 및 Biochanin A를 제외한 6종의 flavonoid가 0.06~0.49mM에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 대한 생성억제작용과 항산화작용을 나타내었고 이중 flavonol 구조의 quercetin과 morin이 각각 0.06mM 및 0.07mM농도에서 현저한 효과를 나타내었다.

**4. 용혈 및 지질과산화의 억제 및 항산화효과**

Flavonoid의 항산화작용을 평가하기 위해 free radical유도 세포손상의 in vitro model을 사용하여 시험하였다.

마우스의 적혈구에 대해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>유도용혈 및 지질과산화에 대한 flavonoid 8종의 용혈억제 및 지질과산화의 항산화효과를 시험하여 그 시험결과를 Table 5에 제시하였다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>유도용혈에 대한 용혈억제작용을 50% 억제농도 IC<sub>50</sub>(mM)로 표시하였다. 시험결과에 의하면 apigenin 및 biochanin A를 제외한 6종의 flavonoid가 억제농도 10<sup>-3</sup>~10<sup>-5</sup>mM에서 용혈억제작용을 나타내었고, 이중 quercetin 및 morin 이 각각 0.6×10<sup>-3</sup>mM 및 2.0×10<sup>-3</sup>mM 농도에서 현저한 효과를

**Table 5.** Inhibitory Effects of Various Flavonoids on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Induced Hemolysis.

Flavonoids	IC <sub>50</sub> (mM)
Catechin	6.3 × 10 <sup>-3</sup>
Epicatechin	4.8 × 10 <sup>-3</sup>
Flavone	1.8 × 10 <sup>-4</sup>
Chrysin	7.8 × 10 <sup>-4</sup>
Apigenin	-
Quercetin	0.6 × 10 <sup>-3</sup>
Morin	2.0 × 10 <sup>-3</sup>
BiochaninA	-

**Table 6.** Antioxidative Effects of Various Flavonoids on Fe(III)-ADP-NADPH Induced Liver Microsomal Lipid Peroxidation(LPO).

Flavonoids	TBAV <sup>a)</sup> (mM.mg protein)	Inhibition ratio of LPO(%) <sup>b)</sup>
None	4.1 × 10 <sup>-3</sup>	-
Catechin	1.9 × 10 <sup>-3</sup>	53.7
Epicatechin	1.8 × 10 <sup>-3</sup>	56.1
Flavone	1.51 × 10 <sup>-3</sup>	63.4
Chrysin	2.61 × 10 <sup>-3</sup>	36.6
Apigenin	1.5 × 10 <sup>-3</sup>	63.4
Quercetin	1.1 × 10 <sup>-3</sup>	73.2
Morin	1.7 × 10 <sup>-3</sup>	53.3
Biochanin A	0.8 × 10 <sup>-3</sup>	80.5

• The complete lipid peroxidizing system consisted of liver microsomal protein(1mg) suspended in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.5 mM NADPH, 0.15mM FeCl<sub>3</sub>. Incubation carried out at 37°C, were initiated by the addition of NADPH.

a) TBAV was indicated as concentration of malondialdehyde(nmol/mg microsomal protein).

b) Inhibition ratio of LPO(%)

$$= \frac{TBAV_1 - TBAV_2}{TBAV_1} \times 100$$

TBAV<sub>1</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured without sample.

TBAV<sub>2</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured with sample.

나타내었다(Table 5).

**5. NADPH 의존성 지질과산화의 억제 및 항산화효과**

1) Paraquat비유도 NADPH 의존성 지질과산화의 억제 및 항산화효과

Flavonoid의 생체시료 중에서 활성산소의 항산화효과를 마우스의 간 및 폐의 microsome 지질과산화반응에 의하여 검토하였다.

Microsome은 불포화지방산을 다량 함유하므로 지질과산화반응이 촉진되며, 항산화효과의 측정에 이용된다.

지질과산화 개시제로써 adenosine-5'-diphosphate(ADP)-Fe(III)과 NADPH를 사용하고 microsome을 37°C에서 1시간 배양한 후 반응중 지질의 산화를 방지하기 위해 BHT 및 EDTA를 가해 TBA 방법으로 측정하고 TBAV를 malondialdehyde양

**Table 7.** Antioxidative Effects of Various Flavonoids on Fe(III)-ADP-NADPH Induced Lung Microsomal Lipid Peroxidation(LPO).

Flavonoids	TBAV <sup>a)</sup> (mM.mg protein)	Inhibition ratio of LPO(%) <sup>b)</sup>
None	$2.80 \times 10^{-3}$	-
Catechin	$0.68 \times 10^{-3}$	75.7
Epicatechin	$0.99 \times 10^{-3}$	64.6
Flavone	$2.13 \times 10^{-3}$	23.9
Chrysin	$0.90 \times 10^{-3}$	67.6
Apigenin	$0.46 \times 10^{-3}$	83.6
Quercetin	$0.63 \times 10^{-3}$	77.5
Morin	$1.51 \times 10^{-3}$	46.1
Biochanin A	$0.58 \times 10^{-3}$	79.3

\* The complete lipid peroxidizing system consisted of liver microsomal protein(1mg) suspended in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.5mM NADPH, 0.15mM FeCl<sub>3</sub>. Incubation carried out at 37°C, were initiated by the addition of NADPH.

a) TBAV was indicated as concentration of malondialdehyde(nmol/mg microsomal protein).

b) Inhibition ratio of LPO(%)

$$= \frac{\text{TBAV}_1 - \text{TBAV}_2}{\text{TBAV}_1} \times 100$$

TBAV<sub>1</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured without sample.

TBAV<sub>2</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured with sample.

(mM/mg protein)으로 표시하였다.

또한 지질과산화에 대한 flavonoid 미첨가시와 첨가시의 TBAV치를 flavonoid미첨가시의 TBAV에 대해 백분율(%)로 표시하여 그 결과를 Table 6 및 7에 제시하였다.

간 microsome의 지질과산화에 대한 8종의 flavonoid의 항산화율을 검토한 결과 flavonoid 미첨가시의 TBAV  $4.1 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein에 대해 0.8~ $2.6 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein의 항산화농도와 36.6~80.5%의 지질과산화 억제율을 나타내어 flavonoid의 전부가 항산화효과를 나타내었으며 quercetin 및 biochanin A는 그 효과가 현저하였다(Table 6).

폐 microsome의 지질과산화에 대한 8종의 flavonoid의 항산화율을 검토한 결과 시료 미첨가시의 TBAV  $2.80 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein에 대해 0.46~ $2.13 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein 항산화농도와 46.1~83.6%의 억제율을 나타내어 flavonoid의 전부가

**Table 8.** Antioxidative Effects of Various Flavonoids on Fe(III)-ADP-NADPH Induced Lung Microsomal Lipid Peroxidation(LPO).

Flavonoids (1mM)	TBAV <sup>a)</sup> (mM.mg protein)	Inhibition ratio of LPO(%) <sup>b)</sup>
PQ+None(PQ)	$9.5 \times 10^{-4}$	-
PQ+Catechin	$5.1 \times 10^{-4}$	46.3
PQ+Epicatechin	$4.7 \times 10^{-4}$	51.6
PQ+Flavone	$4.9 \times 10^{-4}$	48.4
PQ+Chrysin	$3.7 \times 10^{-4}$	60.9
PQ+Apigenin	$3.9 \times 10^{-4}$	58.7
PQ+Quercetin	$2.2 \times 10^{-4}$	77.2
PQ+Morin	$3.6 \times 10^{-4}$	61.8
PQ+Biochanin A	$1.6 \times 10^{-4}$	83.1

\* The complete lipid peroxidizing system consisted of liver microsomal protein(1mg) suspended in 50mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, containing 0.5mM NADPH, 0.15mM FeCl<sub>3</sub>. Incubation carried out at 37°C, were initiated by the addition of NADPH.

a) TBAV was indicated as concentration of malondialdehyde(nmol/mg microsomal protein).

b) Inhibition ratio of LPO(%)

$$= \frac{\text{TBAV}_1 - \text{TBAV}_2}{\text{TBAV}_1} \times 100$$

TBAV<sub>1</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured without sample.

TBAV<sub>2</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured with sample.

항산화효과를 나타내었으며 이중에 catechin, apigenin, quercetin 및 biochanin A는 그 효과가 현저하였다(Table 7).

## 2) Paraquat 유도 NADPH의존성 지질과산화의 억제 및 항산화효과

Flavonoid의 생체시료 중에서 지질과산반응의 억제 효과를 마우스의 간 및 폐의 microsome에 대해 paraquat 유도 지질과산화반응에 의하여 검토하였다.

지질과산화 개시제로서 adenosine-5'-diphosphate(ADP)-Fe(III)-NADPH계를 사용하고 paraquat 단독 및 paraquat와 flavonoid 병용 첨가한 microsome을 37°C에서 1시간 배양후 지질산화를 방지하기 위해 BHT 및 EDTA를 가해 TBA법으로 측정하였고, TBAV를 malondialdehyde양(mM/mg protein)으로 표시하였다(Table 8, 9).

간 microsome의 지질과산화에 대한 8종의 flavo-

**Table 9.** Antioxidative Effects of Various Flavonoids on Fe(III)-ADP-NADPH Induced Lung Microsomal Lipid Peroxidation (LPO).

Flavonoids (1mM)	TBAV <sup>a)</sup> (mM,mg protein)	Inhibition ratio of LPO(%) <sup>b)</sup>
PQ+None	$5.2 \times 10^{-3}$	-
PQ+Catechin	$1.9 \times 10^{-3}$	63.4
PQ+Epicatechin	$2.6 \times 10^{-3}$	50.7
PQ+Flavone	$3.2 \times 10^{-3}$	38.2
PQ+Chrysin	$2.2 \times 10^{-3}$	56.9
PQ+Apigenin	$2.1 \times 10^{-3}$	60.4
PQ+Quercetin	$1.6 \times 10^{-3}$	69.8
PQ+Morin	$1.4 \times 10^{-3}$	72.5
PQ+Biochanin A	$0.78 \times 10^{-3}$	85.0

\* The complete lipid peroxidizing system consisted of liver microsomal protein(1mg) suspended in 50mM Tris-HCl buffer, pH7.5, containing 0.5mM NADPH, 0.15mM FeCl<sub>3</sub>. Incubation carried out at 37°C, were initiated by the addition of NADPH.

a) TBAV was indicated as concentration of malondialdehyde(nmol/mg microsomal protein).

b) Inhibition ratio of LPO(%)

$$= \frac{\text{TBAV}_1 - \text{TBAV}_2}{\text{TBAV}_1} \times 100$$

TBAV<sub>1</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured without sample.

TBAV<sub>2</sub> : microsomal lipid peroxidation was measured with sample.

noid의 항산화율을 검토한 결과 paraquat첨가시의 TBAV  $9.5 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein에 대해  $1.6 \sim 5.1 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein의 항산화농도와 46.3~81.3%의 지질과산화 억제율을 나타내어 flavonoid의 전부가 항산화효과를 나타내었으며 quercetin 및 biochanin A는 그 효과가 현저하였다(Table 8).

폐 microsome의 지질과산화에 대한 8종의 flavonoid의 항산화율을 검토한 결과 paraquat 첨가시의 TBAV  $5.2 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein에 대해  $0.78 \sim 3.2 \times 10^{-3}$ mM/mg/protein의 항산화농도와 38.2~85.0%의 지질과산화 억제율을 보여 flavonoid의 전부가 항산화효과를 나타내었으며 이중에 quercetin, morin 및 biochanin A는 그 효과가 현저하였다(Table 9).

이상의 결과를 볼 때 flavonoid는 paraquat유도 지질과산화반응의 억제 및 항산화작용을 갖고 있어 paraquat의 독성경감제로 유용함을 시준하였다.

## 결론

paraquat 유도독성에 대한 catechin, epicatechin, chrysin, flavone, apigenin, quercetin, morin 및 biochanin A 8종의 flavonoid을 대상으로 하여 활성산소 생성계에서의 superoxide anion 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>유도용혈, paraquat비유도 및 유도의 간 및 폐 microsome의 지질과산화에 대한 항산화작용 및 억제작용을 검토한바 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. catechin, epicatechin, quercetin, 및 biochanin A는 3.3~9.8μM 농도에서 DPPH radical의 50% 제거효과를 나타내었다.

2. catechin, epicatechin, apigenin, quercetin, 및 biochanin A는 0.06~1.86mM의 IC<sub>50</sub>에서 superoxide anion 생성의 억제 및 상산화효과를 나타내었다.

3. catechin, epicatechin, flavone, chrysin, quercetin, 및 morin은 0.12~0.49mM의 IC<sub>50</sub>에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성의 억제 및 항산화효과를 나타내었다.

4. catechin, epicatechin, flavone, chrysin, quercetin, morin 및 biochanin A는  $0.6 \sim 6.3 \times 10^{-3}$ mM의 IC<sub>50</sub>에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 유도 용혈작용을 억제하였다.

5. 8종의 flavonoid는 paraquat유도의 간 및 폐 microsome의 지질과산화에 대해 억제 및 항산화효과를 나타내었다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 8종의 flavonoid는 paraquat에 의한 독성발현시 독성경감제로써 유용하다고 사료된다.

## 참고 문헌

1. Fister, J.K., Life Sci., 19, 421(1976)
2. Rose, M.S., Smith, L.L., Wyatt, I., Biochem.
3. Hassan, H.M., Fridovich, I.: "Biol. & Clin. Aspects of Superoxide and SOD," ed. by Bannister, W.H., et al., P, 57, Elsevier(1980)
4. Matkovic, B., Barabas, K., I. Varg, Sz., Szabo, L., Berencsi, G., Gen. Pharmac., 13, 333(1982)
5. Darr, D.J., Yanni, S., Pinnell, S.R., Free Rad. Biol. & Med., 4, 357(1988)
6. Sinha, B.K., Singh, Y. and Krishna, G.,

- Biochem. Biophys. Res. Commu. 135, 583-588, (1986)
7. Bus, J.S. & Gibson, J.E., In: Hook, G.E.R., ed. Pulmonary toxicology, New York, Raven Press.
  8. Bus, J.S., Aust, S.D., & Gibson, J.E., Biochem. biophys. Res. Commun., 58, 749-755.
  9. Bus, J.S., Aust, S.D., & Gibson, J.E., Res. Commun., Chem. Pathol. Pharmacol., 11, 31-38.
  10. Bus, J.S., Cagen, S.Z., Olgard, M., & Gibson, J.E., Toxicol. Appl. Pharmacol., 35, 501-513. (1976)
  11. Bus, J.S. & Gibson, J.E., Toxicol. appl. Pharmacol., 33, 461-470. (1975)
  12. Bus, J.S. & Gibson, J.E., Rev. Biochem. Toxicol., 1, 125-149. (1979)
  13. Cantin, A.M., North, S.L., Fell, G.A., Hubbard, R.G., Crystal, R.G., J. Clin. Invest. 79: 1965, 1637, 1987
  14. Keeling, P.L., Smith, L.L., & Aldridge, W.N., Bopjem. Biophys. Acta, 716, 249-257. (1982)
  15. Lewis, D.A., Flavonoids. In Lewis, D.A. (eds), Suppl. Vol. 27, Berkhauser Verlage, Basel, 137-165. (1989)
  16. G. Minoti, S.D. Aust, Arch. Biochem. Biophys., 253, 257. (1987)
  17. Otono, S., Fujihira, E., Yakugaku Zasshi, 90, 1347. (1970)