

## 매자나무 세포독성성분 분석\*<sup>1</sup>

김 영 균\*<sup>2</sup> · 곽 병 만\*<sup>2</sup>

## Analysis of Cytotoxic Constituent of *Berberis koreana* Palibin\*<sup>1</sup>

Young-Kyoon Kim\*<sup>2</sup> · Byung-Man Kwak\*<sup>2</sup>

### ABSTRACT

Methanol extracts of five Berberidaceae species were examined against tissue factor inhibitory and tumour cell growth inhibitory activity. Methanol extracts of *Berberis koreana* Palibin showed a strong cytotoxicity activity against SK-MEL-2 (Melanoma) tumour cell lines with more than 90% in 25 $\mu$ g/ml and against A549 (Lung carcinoma), SK-OV-3 (Ovarian cancer), XF498 (CNS cancer) and HCT15 (Colon cancer), other Berberidaceae species except *B. koreana* species have no effect on the tumour cells. Biologically active compound, therefore, was isolated through the activity guided fractionation and purification. The structure was confirmed by NMR, FT-IR and MS to 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-ethyl alcohol. It showed cytotoxicity activity against SNU-C4 tumour cell lines with 50.7% in 50 $\mu$ g/ml. Methanol extracts of 5 Berberidaceae species have no effect on the tissue factor inhibitory activity.

**Keywords:** Berberidaceae, cytotoxic activity, 2-(3,4-dihydroxybenzyl)- ethyl alcohol

### 1. 서 론

우리 조상들은 자연과 더불어 살면서 질병에 대한 대안책을 자연에서 찾고자 하였다. 우리 나라는 사계절이 뚜렷하여 식물 종의 종류도 다양하며 그 가운데 약용으로 사용되는 종류도 상당히 많다 (김재길, 1989; 김태정, 1990; 농업진흥청: 약용식물도감, 1971; 농업진흥청, 1989; 문교부: 한국 동식물도감, 1975).

약용식물은 식물전체를 사용하거나 잎, 줄기, 뿌리, 열매 및 액즙 등의 형태로 여러 목적에 따라 다양하게 사용하였다. 최근에 한방 및 민간요법에서 얻어진 각종 생약제들에 대한 약리 활성을 과학적 실험으로 규명하고 그 효과를 입증하려는 연구가 활발히 진행 중이다 (Bennerr *et al.*, 1973; Biggs & Macfarlane 1962; Chang *et al.*, 1985; Chang *et al.*, 1985; Hwang *et al.*, 1978).

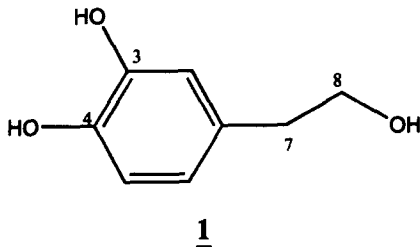
한방에서 이뇨제, 소염제, 간염, 화상치료, 혈압강

\*1 접수 1998년 7월 20일 Received July 20, 1998

본 연구는 한국과학재단 핵심전문 연구비 (KOSEF 961-0608-076-1) 지원으로 수행되었으며 지원에 감사할 드립니다.

\*2 국민대학교 삼림과학대학 임산공학과 (Department of Forest Products, College of Forest Science, Kookmin University)

하 등에 사용되고 있는 매자나무는 진통제, 호흡기 질환, 항암, 항결핵, 항균, 유아설사 등에 효과가 있다고 보고되었다(박재익, 1990; 한국자연연구소, 1983). 그러나 국내산 매자나무 식물에 대한 연구가 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내산 매자나무인 *Berberis koreana* Palibin을 비롯하여 다른 4종의 Berberidaceae (*Berberis amurensis* var *litifolia* Nakai, *Berberis juliance* Schneid, *Berberis amurensis* var *quelpaertensis* Nakai, *Berberis poiretii* Schneid)를 대상으로 이들 수목의 methyl alcohol (MeOH) 추출물의 항암 활성효과 (*in vitro* cytotoxicity activity)와 조직인자의 활성억제 효과에 대한 평가결과, 암세포독성에 활성을 보이는 물질인 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-ethyl alcohol (**1**)의 분리와 구조규명에 대한 결과를 보고하고자 한다.



## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

본 연구의 시료로 사용한 5수종의 Berberidaceae는 경기도 포천군 소흘면 직통리 소재 광릉수목원에서 채집한 1) *B. koreana* Palibin, 2) *B. amurensis* var *litifolia* Nakai, 3) *B. juliance* Schneid, 4) *B. amurensis* var *quelpaertensis* Nakai, 5) *B. poiretii* Schneid를 음건하여 마쇄한 후 사용하였다.

### 2.2 시약 및 기기

Speed vac은 Savant SC210A를 사용하였으며, FT-IR은 Jasco FT/IR-300E(Japan)를 사용하였고,  $^1\text{H}$ · $^{13}\text{C}$ , COSY NMR spectrum을 얻기 위하여 Varian Unity-Inova-300(300MHz, U.S.A.)를 이용하였다. GC-MS는 Shimadzu QP-5000(Japan)으로 측정하였다.

생리활성 물질을 분리하기 위하여 HPLC는

Waters 501 pump system과 Waters R401(RI)·Waters 486(UV) detector를 사용하였다. 또한 column은 Prep Nova-Pak HR Silica 및 HR C18 column을 사용하였다. Column chromatography용 packing materials는 Silica gel 60G (230~400mesh, 60~200mesh, Merck Co.), Bakerbond C18 (J.T.Baker Co.)과 Sephadex LH-20 (25~150  $\mu\text{m}$ , Sigma chemical Co.)을 사용하였다. TLC는 pre-coated TLC plate (RP-18 F<sub>254s</sub>, Silica gel 60G, Merck Co.)를 사용하였다. 회전 감압 농축기는 Rotary R-110(Büchi Co.)를 이용하였고, 시료추출 및 column chromatography용 용매는 재증류하여 사용하였으며, 기타 시약은 특급 및 1급 시약을 사용하였다.

### 2.3 추출액 제조 및 분획

5수종의 Berberidaceae 즉, 1) *B. koreana* Palibin, 2) *B. amurensis* var *litifolia* Nakai, 3) *B. juliance* Schneid, 4) *B. amurensis* var *quelpaertensis* Nakai, 5) *B. poiretii* Schneid를 음건하여 마쇄한 후 각각의 시료를 MeOH 용매에 3일간 상온에서 침적시킨 후 3회 반복 추출하여 회전 감압 농축기를 사용하여 농축한 후 deep freezer(-40°C)에 보관하였으며 이것을 소량씩 취하여 생리활성검정에 사용하였다.

상당한 암세포 성장 억제 효과가 나타내는 *B. koreana* P. 1.5Kg을 MeOH 10L(×3)로 추출한 후, 200g의 MeOH 추출물을 분획여두로 *n*-hexane과 MeOH로 분획하였다. 이때의 상층부인 *n*-hexane 가용부를 얻고, MeOH 가용부에 다시 *n*-hexane 용매로 2회 추출하여 *n*-hexane 분획 10g을 얻었다. 하층의 MeOH 가용부를 농축한 후 chloroform(CHCl<sub>3</sub>)과 H<sub>2</sub>O를 사용하여 용매 분획 하였다. 하층의 CHCl<sub>3</sub> 가용부를 얻기 위하여 CHCl<sub>3</sub> 용매로 3회 반복 추출하여 CHCl<sub>3</sub> 분획 10g을 얻었다. 상기와 같은 방법으로 2g의 ethylacetate (EtOAc) 분획과 buthanol(BuOH) 분획 25g을 얻었으며, BuOH 불용부 53g을 H<sub>2</sub>O 분획으로 하였다. 이렇게 하여 얻어진 5가지 분획을 생리활성을 측정하였다.

### 2.4 생리활성측정

#### 2.4.1 항암작용 검색 방법

계대중의 암세포들을 typosin-CDTA 용액으로 처리하여 용기 부착면으로부터 분리시키고, 96-well

flat bottom microplate (Falcon)에 각 well 당 세포 수가 각각  $5 \times 10^3$  (A549, HCT15),  $1 \times 10^4$  (SK-MEL-2, XF498),  $2 \times 10^4$  (SK-OV-3)가 되도록 희석하여 분주하였다. 이들을 CO<sub>2</sub> incubator 속에서 24시간 배양하여 cell이 well의 바닥 면에 부착(anchor)되도록 한 후 aspirator로 media를 제거하였다. Media에 녹여둔 검체를 농도별로 각각의 well 속에 넣어주고 48시간 동안 배양하였다. 검체 용액을 조제할 때는 media만을 사용하여 검체를 녹이는(dissolve) 것을 원칙으로 하지만 특히, 검체가 난용성일 경우에는 소량의 ethyl alcohol(EtOH) 혹은 dimethyl-sulfoxide(DMSO)를 가하여 줄 수도 있다. 그러나 이런 경우에 EtOH 또는 DMSO의 최종농도가 1%를 초과하지 않아야 한다. 또 검체 용액을 암세포에 가할 때는 미리 filter로 여과하여 무균 상태를 유지시켜 주었다.

48시간 동안의 배양을 마친 후 각 well 속의 media를 aspiration으로 제거하고, 10% trichloroacetic acid(TCA) 용액을 각 well당 10 $\mu$ l씩 가한 후, 1시간 동안 상온에서 방치하여 세포들을 고정시켰다. 이를 물로 5~6회 세척하여 과잉의 TCA 용액을 완전히 제거하고 건조시켰다. 각 well당 100 $\mu$ l씩의 SRB 염색용액(0.4% sulforhodamine in 1% acetic acid)을 가하여 30분간 염색한 후 과잉의 염색액은 1% acetic acid로 5~6회 반복 세척하여 상온에서 건조시켰다. 각 well당 100 $\mu$ l씩의 10mM Tris base (unbuffered) 용액을 가한 후 titer-plate shaker로 10분간 진탕하여 cell에 염색된 염색액을 용출시키고 microplate reader를 이용하여 520nm의 흡광도를 측정하였다.

각각의 농도에서 측정된 검체군의 암세포 증식율을 바탕으로 하여 LOTUS program의 data regression을 사용하여 검체가 해당 암세포의 성장률 50% 저해하는 농도(ED<sub>50</sub>)를 계산하고 이 ED<sub>50</sub>값을 기준으로 하여 각 검체의 항암 효과의 potency를 상호 비교하는 지표로 삼았다.

#### 2.4.2 조직인자 저해작용 검색

혈액응고의 억제효과에 대한 활성검정은 혈액응고 개시에 관여하는 조직인자의 활성을 저해하는 효과를 검색하는 방법을 취하였다. 작용검색은 조직인자의 저해작용에 대한 효과를 검정하기 위한 TF원은 흰쥐 뇌의 microsome 분획을 사용하고 TF활성은 one-stage prothrombin time을 측정하였다. *in vivo* 실험은 흰쥐 뇌 및 폐의 TF활성, bleeding time,

whole blood clotting time, plasma recalcification clotting time 측정을 하였다.

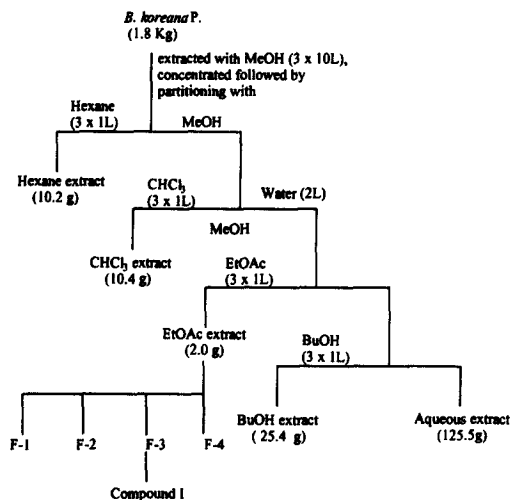
5회에 걸쳐 흰쥐 25마리의 폐의 TF를 조제하고 이것을 여러 농도로 희석하여 흰쥐 9마리에서 얻은 혈장에 대하여 one-stage clotting assay를 실시하였다. 혈장 응고시간이 18초가 될 때를 100% TF activity로 정하고, TF를 넣지 않고 saline만 넣은 혈장의 응고시간을 0% activity로 하여 각 농도에 따른 clotting acceleration %를 다음 Eq.1에 의해 계산하였다.

$$\text{clotting acceleration (\%)} = \frac{BL - A}{BL - 18} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

여기에서 BL은 TF를 넣지 않고 saline만 넣었을 때의 prothrombin time, A는 TF를 넣었을 때의 prothrombin time이다. 농도를 log scale로 X축에, clotting acceleration %를 Y축에 표시하여 standard curve를 그렸으며 이 graph에서 50% TF activity가 되는 TF의 양을 임의로 1unit으로 정하였다.

#### 2.5 Compound 1의 단리

*B. koreana* P.의 5가지 분획에 대한 생리 활성 측정 결과 EtOAc 분획에서 강한 암세포 성장 억제 효



Scheme 1. Procedure for the Purification of Cytotoxicity Compound from *B. koreana* P.

과가 관찰되었다. 따라서 silica gel column (n-Hexane:EtOAc, n-Hexane:EtOAc:MeOH)과 Bakerbond (J. T. Baker Co.)로 충전한 C<sub>18</sub> column chromatography(MeOH:H<sub>2</sub>O) 그리고 HPLC(trimethylpentane:ethylacetate, 7/1(v/v), 1.5ml/min.)를 실시하여 compound I를 분리하여(Scheme 1) retention time이 12.8인 95% 이상의 순도로서 미적색의 유상(58mg)을 얻었다. Vanillin 염색에서 특징적인 적갈색으로 나타나고 TLC의 R<sub>f</sub>는 0.4(hexane:ethyl acetate 2/3(v/v))로 관찰되었다.

IR (KBr)  $\nu_{\max}$  cm<sup>-1</sup> 3200 (OH), 2950 (C-H), 1680 (C=O), 1640 (conjugated C=C)

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 2.6(2H, t, 7-H), 3.6(2H, t, 8-H), 4.8(brs, OH), 6.5(1H, dd, J=2.1Hz, 8.7Hz, 6-H), 6.6(1H, d, J=2.1Hz, 2-H), 6.7(1H, d, J=8.7Hz, 5-H)

<sup>13</sup>C-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  :140.2 (C-3), 138.7 (C-4), 125.9 (C-1), 115.4 (C-2), 111.2 (C-5), 110.4 (C-6), 58.7 (C-8), 33.8 (C-7)

MS m/z 210[M]<sup>+</sup>, m/z 179[M-CH<sub>2</sub>OH]<sup>+</sup>

### 2.5.1 Compound I의 Acetylation

compound I 22mg을 pyridine 1ml에 녹이고 acetic anhydride 1ml를 가하여 하룻밤 방치한 후 cold H<sub>2</sub>O와 n-hexane으로 용매 분획 하였다. 이때 얻은 상층부의 n-hexane fraction을 chromatography를 이용하여 분리·정제하였다.

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  : 2.8(2H, t, 7-H), 4.2(2H, t, 8-H), 2.18(OAc, s), 2.19(OAc, s), 1.9(OAc, s), 7.0(1H, s), 7.1(1H, d, J=2.4Hz) 7.1(1H, s)

## 3. 결과 및 고찰

다섯종의 Berberdaceae 즉, 1) *B. koreana* Palibin, 2) *B. amurensis* var *litifolia* Nakai, 3) *B. juliance* Schneid, 4) *B. amurensis* var *quelpaertensis* Nakai, 5) *B. poiretii* Schneid을 채집하여 음건한 후 마쇄한 시료를 MeOH로 추출하였

다. 이 추출액을 감압 농축하여 건조 엑스를 만들고 5개의 *in vitro* tumor cell line(A549, SK-OV-3, SK-MEL-2, XF498 and HCT15)에 대한 세포 성장 억제 효과를 측정하였다.

이들 추출물의 MeOH 추출물에 대한 세포 독성을 측정한 결과 *Berberis koreana* P.에서만 강한 세포 독성이 관찰되었고, 다른 4수종에서는 세포독성 효과가 나타나지 않았다.

따라서 활성분획을 얻기 위하여 *B. koreana* P.의 MeOH 추출물을 n-Hexane, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, BuOH, H<sub>2</sub>O로 용매 분획하여 동일 tumor cells line을 통해 세포 성장 억제 효과를 측정한 결과, n-Hexane, BuOH, H<sub>2</sub>O 분획에서는 세포 성장 억제 효과가 없었으며, CHCl<sub>3</sub> 분획과 EtOAc 분획에서는 선택적으로 SK-MEL-2 cell의 성장을 25 $\mu$ g/ml에서 90% 이상의 억제효과가 나타남을 관찰하였다.

계속해서 이들 세포 성장 억제 효과가 나타나는 EtOAc 분획에서 유효성분을 찾기 위해 flash column chromatography를 이용하여 n-Hexane과 EtOAc의 혼합용매로 fractionation 한 후 이 중 활성을 나타내는 분획에서 Silica Gel chromatography를 이용하여 분리하고 HPLC로 compound I를 정제하였다(Scheme 1).

compound I에 대하여 세 가지의 tumour 세포의 성장 억제 효과를 검정한 결과, 50 $\mu$ g/ml에서 SNU-C4 cell (colon cancer cell line)의 성장을 50.7% 억제함을 관찰할 수 있었다. 또한 P388과 L1210 세포에 대하여도 상당한 세포 성장 억제 효과가 있음을 관찰할 수 있었다 (Table 1).

Compound I은 Vanillin 염색에서 적색으로 나타나고, TLC의 R<sub>f</sub>는 0.4(hexane:ethyl acetate 2/3(v/v))로 관찰되었으며, normal phase HPLC에서 retention time이 12.8(trimethylpentane:ethyl acetate, 7/1(v/v), 1.5ml/min.)인 95% 이상의 순도를 가지는 물질로 확인되었다.

Compound I의 IR spectrum이 나타내는 특징적인 흡수대는 ~3200cm<sup>-1</sup>, 2950cm<sup>-1</sup>, 1680cm<sup>-1</sup>, 1640cm<sup>-1</sup>로 이들은 각각 hydroxyl group을 비롯하여, aliphatic C-H, C=O 신축 진동에 의한 band, 그리고 conjugated된 C=C에 해당하는 band임을 확인할 수 있다.

<sup>1</sup>H-NMR spectrum(Fig. 1)에서 4.8ppm에 나타나는 broad한 peak는 OH group에 기인하는 것이며, 2.6ppm 과 3.6ppm 에서는 7-H에 의한 triplet peak

Table 1. Cell growth inhibitory activity of compound I of *B. koreana* P. EtOAc fraction

Concentrate ( $\mu\text{l}/\text{ml}$ )	Cells		
	P388	L1210	SNU-C4
25.00	-	-	-
50.00	-	-	5.02
100.00	- 19.34	14.98	- 25.34
200.00	- 28.00	10.69	- 50.07

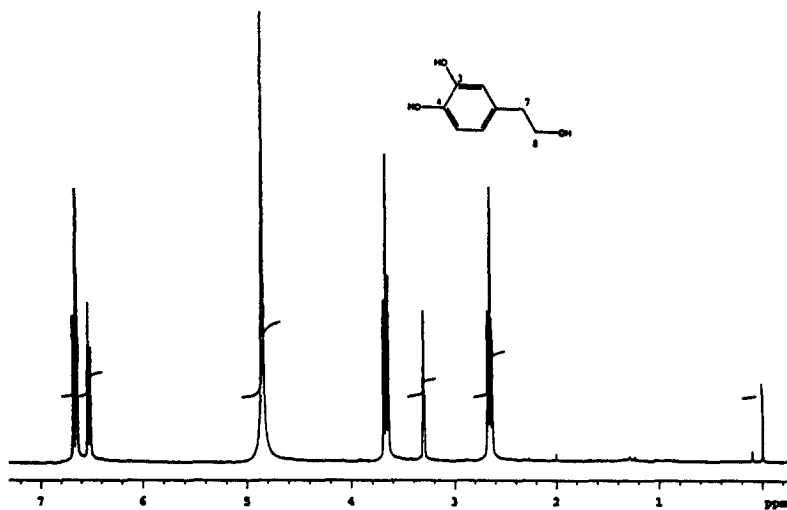


Fig. 1.  $^1\text{H}$ -NMR spectrum of Compound I,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ .

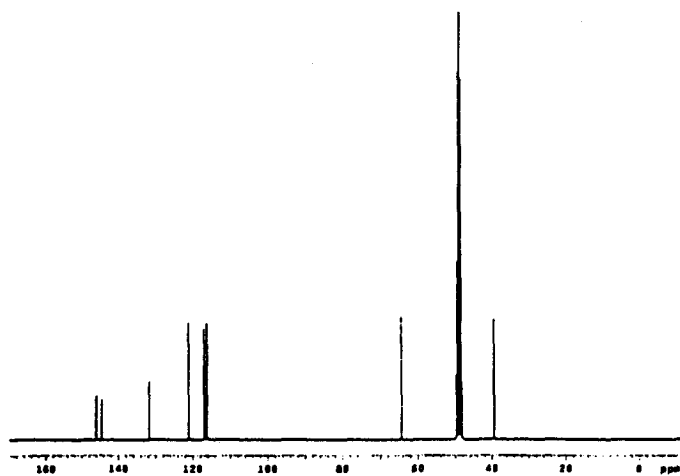


Fig. 2.  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum of Compound I,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$ .

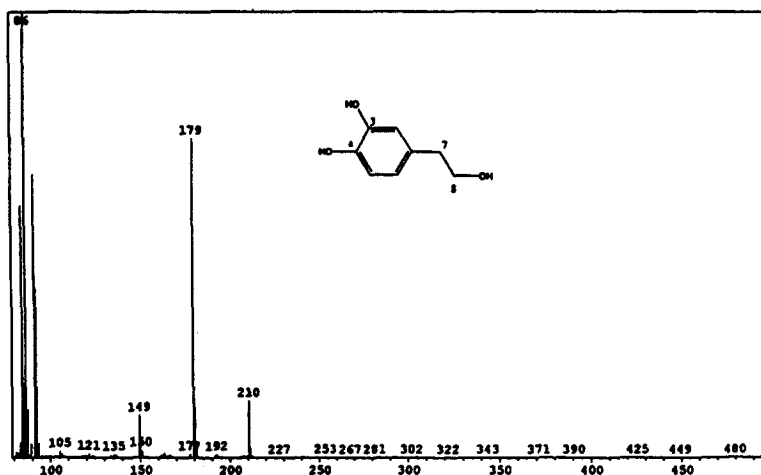


Fig. 3. EI-MS spectrum of Compound I.

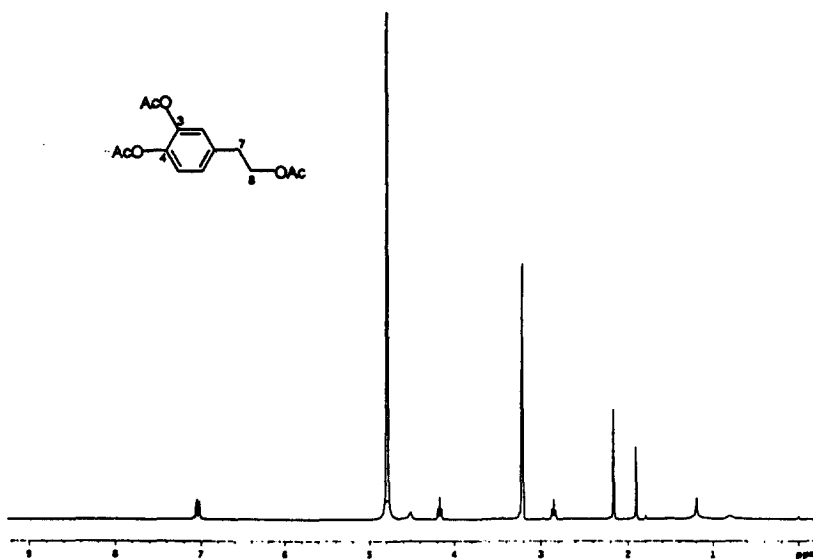


Fig. 4. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of Triacetate of Compound I, CD<sub>3</sub>OD, δ.

와 8-H에 의한 triplet peak가 각각 나타났다. 6.5ppm의 doublet of doublet ( $J=2.1\text{Hz}$ ,  $8.7\text{Hz}$ ) 과 6.6ppm의 doublet ( $J=2.1\text{Hz}$ ) peak 그리고, 6.7ppm에서 보인  $J=8.7\text{Hz}$ 인 doublet peak는 이것이 trisubstituted phenolic compound임은 물론 이들의 coupling constants로 미루어 볼 때 catechol 골격임을 알 수 있다.

<sup>13</sup>C-NMR spectrum(Fig. 2)에서는 140.2ppm과 138.7ppm에서 3과 4번 탄소의 peak로 assign 할 수 있으며, 111.2, 110.4, 115.4ppm에서 각각 5번, 6번,

그리고 2번 carbon에 해당하는 peak를 볼 수 있다. 125.9ppm에서는 C-1, 그리고 58.7ppm과 33.8ppm에서 각각 8,7번에 해당하는 carbon의 peaks로 assign 하였다.

또한 MS(Fig. 3)를 통해 분자이온 peak가  $m/z$  210이며,  $[M-\text{CH}_2\text{OH}]^+$ 에 기인한 peak를  $m/z$  179에서 볼 수 있다.

3번과 4번 그리고 8번에 붙어 있는 3개의 hydroxyl group을 assign 하기 위하여 compound I (22mg)을 pyridine(1ml)에 녹이고 acetic anhydride (1ml)를

가하여 하룻밤 방치한 후 cold H<sub>2</sub>O와 *n*-hexane으로 용매분획 하였다. 이때 얻은 상층부의 *n*-hexane-fraction을 Silica Gel chromatography를 이용하여 아세틸화된 compound를 얻었다. 이 유도체의 <sup>1</sup>H-NMR spectrum (Fig. 4)을 보면 방향족 OH에 결합한 2개의 acetyl기는 2.18ppm과 2.19ppm에서 peak가 나타나며 methylene-OH에 결합한 acetyl기에 기인한 peak가 1.9ppm에서 나타난다.

또한, 이물질의 2D Homonuclear <sup>1</sup>H-NMR spectrum(COSY, Fig. 5)을 통하여 7번과 8번의 2개의 methylene protons이 서로 coupling하는 cross peak(↔)와 과 5번과 6번의 benzylic protons이 역시 서로 coupling 하는 cross peak(↓↓)를 관찰할 수 있다.

이상의 물리·화학적 및 분광학적 자료를 종합한

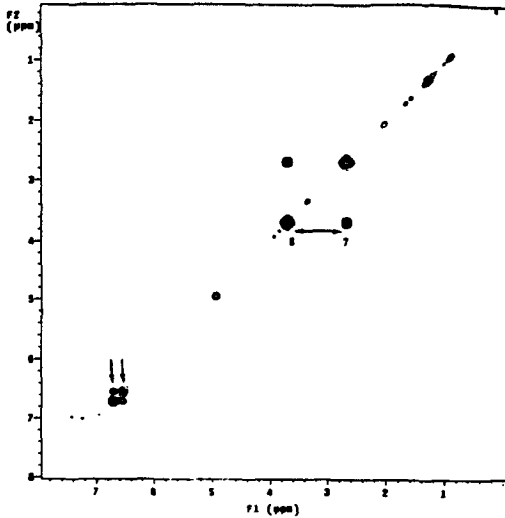


Fig. 5. <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H-COSY NMR spectrum of Compound I.

결과 이 물질을 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-ethyl alcohol로 동정하였다.

조직 인자의 활성 억제 실험에서는 5수종의 Berberidaceae 모두 IC<sub>50</sub><100μg/ml으로 활성이 없었다 (Table 2).

## 4. 결 론

매자나무과 식물의 잎, 줄기나 뿌리의 성분 동물생체의 자궁수축, 심박수 증가, 심근의 수축증가, 혈관 확장 및 혈압강하를 비롯하여 염증의 감소효과 그리고 암세포의 성장을 억제하는 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 세계적으로 40여종의 매자나무과 식물에 대한 여러 가지 생리활성 성분연구가 진행되고 있으나 국내산 매자나무에 대한 연구가 미비한 실정이다.

본 연구에서는 국내산 매자나무를 비롯한 4수종의 수피 추출물에 대해 항암 효과 및 조직 인자 억제 작용을 검색하였으며, 그 연구결과를 요약하면 다음과 같다.

- 1) 국내산 매자나무는 SK-MEL-2 tumor cell에 대해 25μg/ml에서 90% 이상 암세포의 성장 억제 효과를 보였으며, A549, SK-OV-3, XF498, HCT15 tumor cells에 대해서도 상당한 억제효과를 나타냈다. 그러나 국내산 매자나무를 제외한 4수종의 매자 나무는 항암 효과가 나타나지 않았다.
- 2) *B. koreana* P.의 MeOH 추출물을 용매분획하여 동일 tumor cells line을 통해 항암효과를 살펴 본 결과 CHCl<sub>3</sub> 분획과 EtOAc

Table 2. Tissue factor inhibitory activities of five samples in Berberidaceae.

Sample code	IC <sub>50</sub> /TF unit(μg)	Remarks*
<i>B. koreana</i> P.	>100	E
<i>B. amurensis</i> var <i>quelaertensis</i>	"	E
<i>B. amurensis</i> var <i>litifolia</i>	"	E
<i>B. juliance</i>	"	E
<i>B. poiretii</i>	"	E

\* A; IC<sub>50</sub>/TF unit < 0.1μg    B; 0.1μg < IC<sub>50</sub>/TF unit < 1μg    C; 1μg < IC<sub>50</sub>/TF unit < 10μg

D; 10μg < IC<sub>50</sub>/TF unit < 100μg    E; IC<sub>50</sub>/TF unit > 100μg

분획에서 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도에 90% 이상 암세포의 성장 억제 효과를 보였다.

- 3) EtOAc 분획에서 유효성분인 2-(3,4-dihydroxybenzyl)-ethyl alcohol을 분리하였으며, SNU-C4 tumor cell에 대해 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 50.7% 억제 효과가 나타났다.
- 4) 매자나무과 식물 5수종(*B. Koreana* Palibin, *B. julianae* Schneid, *B. amurensis* var *litifolia* Nakai, *B. poiretii* Schneid, *B. amurensis* var *wuellaertensis* Nakai)에 대한 조직인자의 활성억제 효과는 IC<sub>50</sub><100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 활성을 보이지 않았다.

## 참 고 문 헌

1. Bennert, S. H., et al. 1973. Effects of autotransfusion on blood elements. *Am. J. Surg.* 125 : 273
2. Biggs, R. P. & Macfarlane, R. G. 1962. Human blood coagulation and its disorders, 3rd ed. : F. A. Davis Company, Philadelphia.
3. Moon. K. M., Lee. B. C., Lee. S. H and Kang. T. L. 1985. Effects of antitumor polysaccharides from *Alhizzajulihressin* on immune function. *Arch. Pharmacol Res.* 8(4) : 277~282.
4. Moon. C. K., Park. K. S., Lee. S. H and Yoon. Y. P. 1985. Antitumor activities of several phytopolysaccharides. *Arch. Pharmacol Res.* 8(1) : 44.
5. Hwang. W. I., Im. M. J. and Ju. J. S. 1978. A study on the Cytotoxic Activity of extract (urushiol) of Lacquer Sap against L5178 cells. *Korean J. Biochem.*, 10(1) : 17.
6. 김재길. 1989. 원색 천연 약물 대사전(上, 下). 서울. (上) : p.321, (下) : pp.163, 293, 305.
7. 김태정. 1990. 약용식물. 대원사, 서울, pp.1~3, 116~117.
8. 농업진흥청. 1971. 약용식물도감. p.2, 10, 19, 81, 179.
9. 농업진흥청. 1989. 한국의 자생식물.
10. 문교부. 1975. 한국 동식물도감, 제 15권 식물편 (유용식물). p.313, 322, 337.
11. 박재익. 1990. Sarcoma 180 Tumor cells에 대한 생약 복합 제제의 항암효과. 충북대 석사학위.
12. 이종규 감수. 1963. 민간치료법전서. 우일사, pp.376~380.
13. 황우익, 이성동, 오수경. 1982. 한약제의 약리작용에 관한 연구. *한국생화학회지*, 15(3) : 205.
14. 한국자원 식물연구소. 1983. 한국 자원식물, 미도문화사. 서울.