

포제방법에 따른半夏의 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde 함량 및 안정성 평가

한중현 · 조성균 · 이미정 · 백승화¹ · 박성혜*

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1:충북도립대학 식품생명과학과

Contents of Homogentisic acid and 3,4-Dihydroxybenzaldehyde in the *Pinellia ternata* by Various Processing Method and Its Safety Estimate

Jong Hyun Han, Sung Gyun Jo, Mi Jeong Lee, Seung Hwa Baek¹, Sung Hye Park*

Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,

1: Department of Food Science & Biotechnology, Chungbuk Provincial University of Science & Technology

This study was carried out for establishment of toxicological monitoring system in oriental medicinal plants. Hence on our research, we used Banha(*Pinellia ternata*) and Kangbanha, Bubbanha, Jaebanha, Geokbanha by distinguished processing methods. These are frequently used in Bangyakhabeon, which is one of the most well-known clinical book in oriental medicine. As we reviewed the reported documents, we judge homogentisic acid(HA) and 3,4-dihydroxybenzaldehyde(3,4-DBA) as poisonous substance and to verify its existence, we established analysis condition of HPLC by gaining sequential fraction extracts and studied the degree of its virulence to provide basic information on the guidelines of using this medicine. Optimum condition of HPLC was H₂O : MeOH : CH₃COOH (57:35:8) in HA and 3,4-DBA analysis. HA content of raw Banha was 11.03mg/100g and HA contents of its processed product were decreased. Exceptionally, Jaebanha was increased in 175.97% than raw Banha. 3,4-DBA content of raw Banha was 2.93mg/100g and 3,4-DBA contents of its processed product were decreased. These results will be applies in intake guideline establishment, quality control and stability evaluation of oriental medicinal plants.

Key words : *Pinellia ternata*, homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, cytotoxicity

서 론

천연물을 기원으로 하는 생약은 기존에 한방에서의 질병치료제나 보약의 처방으로 널리 사용되어 왔으나 최근 들어서는 각종 식품의 감미료, 향료, 건강보조식품이나 기능성 식품, 기능성 화장품, 천연살충제 등의 원료로 매년 사용량이 증가되고 있다¹⁾. 그러나 그에 대한 안전성은 단지 오래전부터 한방에서 쓰여왔다는 사실만으로 충분히 검토되고 있지 않은 실정이다. 따라서 생약의 대중화는 물론 천연물로부터의 새로운 생리활성물질 탐색 차원에서 생약제제에 대한 안전성과 품질관리에 대한 검토는 시급한 연구분야이다^{2,3)}. 이에 따라 본 연구에서는 식품의약품안

전청 고시 제 2000-18호에 의해 식품원료로 고시되었고⁴⁾, 한방임상의서인 方藥合編⁵⁾의 처방 중 활용빈도가 높은 한약재로 기술되어 있는 반하에 대한 연구를 계획하였다.

반하는 천남성과(Araceae)에 속하는 끼부룻(*Pinellia ternata*)의 덩이줄기를 사용하는 생약으로 antiemesis^{6,7)}, sedation⁸⁾, diuresis^{9,10)}, expectoration^{5,9,12)}, antisecretion⁹⁾, anticancer^{5,9)}, antiulceration¹³⁾ 및 antiinflammation^{14,15)} 작용 등을 가지고 있는 것으로 알려져 있어 半夏白朮天麻湯, 半夏瀉心湯, 小柴胡湯 등에 사용되어 왔다^{5,12,14,15)}. 포제를 하지 않은 반하는 혀를 찌르는 듯한 얼얼하고 아린 맛을 가지며 비당질부분은 강한 매운맛을 낸다¹⁶⁾. 반하는 steroids, alkaloids, polysaccharides 및 phenolic compounds, protein, amino acids 등으로 구성되어 있는데¹⁷⁻²⁰⁾, 주요 약리성분은 homogentisic acid 와 3,4-dihydroxybenzaldehyde를 포함한 20여가지로 알려져 있고²¹⁻²⁴⁾ 이들 중 일부는 다양한 약효를 나타내어 adjuvant 역할을 하지만²²⁾, 고용량에서는 alkapturia,

* 교신저자 : 박성혜, 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

· E-mail : psh0528kr@hanmail.net, · Tel : 063-850-6939

· 접수 : 2004/03/24 · 수정 : 2004/04/21 · 채택 : 2004/05/25

mucosal irritation, asthma, salivation, vomiting, hoarseness, aphonia, spasm, tachypnea, breath shortness, paralysis, hepatic dysfunction, hematuria 등을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다^{9,16,25}. 하지만 반하의 독성에 대한 보고들은 아주 고전적이고 단편적인 것이어서 이러한 내용을 근거로 안전성을 정확히 판단하기는 곤란하다. 따라서 반하의 안전한 이용을 위해서는 안전성 평가기준에 따른 재평가가 이루어져야 할 것이다. 반하에는 choline, homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, potassium oxlate, saponin 및 alkaloid가 문헌상 독성물질로 알려져 있다¹⁶⁻²⁰. 이들 중 독성이 가장 강하고, 포제방법에 의해 그 독성이 감소된다고 보고된 물질인 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde를 우선적으로 선정하였다.

이에 따라 본 연구에서는 가장 기초단계로 반하의 유독성분인 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 분석방법의 확립 및 포제 방법에 따라 이들 물질의 함량을 측정하고 세포실험을 통해 안전성을 평가하여 반하를 이용한 여러 독성실험에 있어 용량설정 및 실험설계를 위한 기초자료를 제시하고 약재사용에 대한 가이드라인을 설정하는데 기초자료를 제공하고자한다.

재료 및 방법

1. 생반하 및 각종 포제 반하의 준비

생반하는 고려한약도매약업사에서 구입하였다. 생반하를 이용하여 본 실험실에서 아래 방법에 의한 포제과정을 거쳐 강반하, 법반하 및 제반하를 만들었으며 시판되고 있는 반하의 포제 제품인 강반하, 법반하, 곡반하 등을 구입하여 총 7가지의 반하를 시료로 결정하였다. 본 실험에서 사용한 포제방법은 아래와 같다^{26,27}.

1) 강반하(戔半夏)

생반하 500g을 취하여 물속에 잠기도록하여 5일간 방치하며 매일 1회씩 물을 갈아준다. 5일 후 명반 50g, 생강편 65g을 넣고 삶기 시작한다. 3~4시간 정도 지난 후 마설감(麻舌感)을 확인하여 마설감이 없어질 때까지 삶아서 꺼낸 후 햇볕에 말린다. 포제 후 얻어진 강반하 중량은 약 340g이었다.

2) 법반하(法半夏)

생반하 500g을 취하여 물속에 잠기도록하여 매일 1회씩 물을 갈아주면서 5일간 방치한다. 5일 후 명반 50g을 녹인 물에 다시 5일간 침치한다. 5일 후 명반수를 버리고 석회 100g, 생강즙 15.6g, 감초 15.6g을 넣은 물에 5일간 또 다시 침포 후 꺼내서 햇볕에 말린다. 포제 후 중량은 약 437g이었다.

3) 제반하(製半夏)

생반하 500g을 물에 침포하고 명반 100g, 생강즙 75g을 넣고 골고루 섞는다. 이것을 항아리에 넣고 물량이 약면의 약 9cm정도 위까지 되도록 붓고 2일간 절인다. 2일 후 명반을 제거하여 햇볕에 말린다. 포제 후 중량은 약 404g이었다.

2. 반하의 수분 및 회분 정량

수분과 회분 함량은 본 연구에서 사용한 반하가 적합한 규격임을 확인하기 위한 과정으로 이루어졌으며 7가지 약재에 대

해 수분과 회분 함량은 식품공전의 일반시험법²⁸에 준하여 실시하였다. 즉 수분은 건조 감량법, 회분은 탄화에 의한 함량법으로 그 양을 정량하였다.

3. 각 반하의 추출 및 증발건조

유독성분인 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 용해도를 조사한 결과와 여러문헌^{29,31}을 통해서 고찰해볼 때 최종 추출용매를 70%-알코올로 선정하였고 경제성을 고려하여 70%-메탄올로 최종 결정하였다. 각 약재를 일정량 취하여 시료 무게의 9배 용량의 70%-메탄올로 3시간 환류추출하여 거즈로 여과하였고 또 다시 6배의 70%-메탄올로 2시간 추출하였다. 즉 총 시료량의 15배의 70%-메탄올로 환류냉각방식으로 80~85℃에서 5시간 추출하여 방냉 후 여과하여 또 다시 원심분리하여 상징액 취하였다. 그 상징액을 evaporator(Eyela N-100, Japan)로 증발건조하여 건조물을 준비하였다.

4. 증발·건고물의 분획별 추출

70%-메탄올로 추출 후 증발·건고하여 얻어진 추출물을 chloroform, ethylacetate, n-butanol 및 H₂O로 순차추출하였다²⁹. 용매 분획별 추출과정은 Fig. 1과 같다.

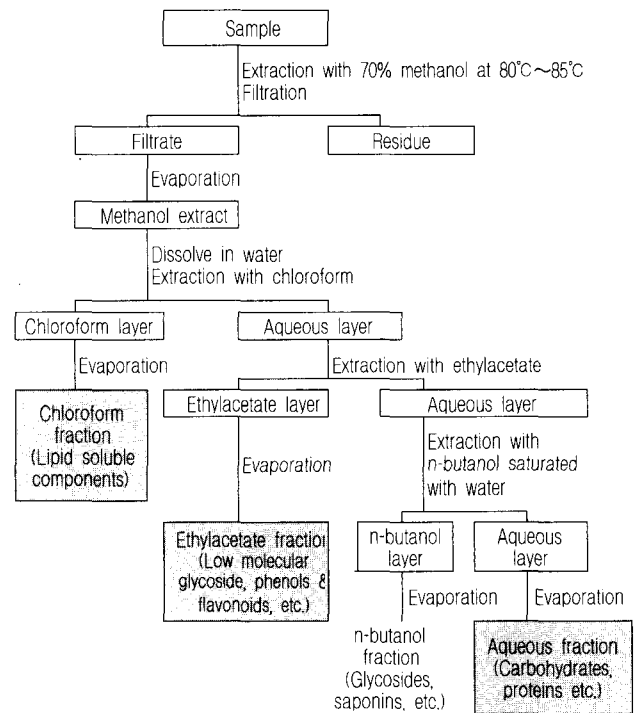


Fig. 1. General procedures for systematical fraction of chemical components

5. HPLC에 의한 독성물질의 확인 및 정량

Homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 정량을 위한 조건을 HPLC를 이용하여 확립하고자 하였다.

이 때 사용한 homogentisic acid는 Sigma社의 H-0751, 3,4-dihydroxybenzaldehyde는 Aldrich社의 D10840-5였고 HPLC

용 메탄올, 물 및 초산은 모두 Baker社의 LC용 특급시약이었다.

6. 세포를 이용한 독성여부 및 정도 확인

MTT assay는 세포의 viability를 알아보는데 적합한 방법이므로 in vitro 상에서 독성정도를 알아내기 위하여 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay 이용하였다. Living cell은 active mitochondrial dehydrogenase enzyme에 의해서 MTT를 cleavage함으로써 yellow에서 violet으로 purple formazan을 형성하며, insoluble purple formazan은 DMSO(Dimethyl Sulphoxide)에 의해 용해된다. 그러나 dead cell은 위와 같은 기전이 일어나지 않으므로 이 원리에 의해 cell viability를 측정할 수 있다.

1) 시료의 제조 및 처리

한약재의 통상섭취 방법이 열수추출에 의한 것이므로 약재를 물에 추출하여 freeze-drying 한 후 각 농도별로 조제하여 세포에 처리하였다. 이때 사용된 시약, 기기 조건은 Table 1과 같다. 각 증 반하의 vero cell의 생육 저해정도를 조사하기 위하여 추출액을 DMEM broth에 대하여 최종농도가 100µl, 50µl, 25µl 및 10µl수준이 되도록 처리하였다.

Table 1. Conditions of cell toxicity test

Cell	: VERO(monkey, kidney)
Media	: DMEM(10% FBS, 1% Antibiotic-Antimycotic) : FBS (Cat No. 26140, Gibco)
Reagent	: Antibiotic / Antimycotic (Cat No. 15240-062, Gibco) : DMEM (Cat No. 12800-058, Gibco) : MTT (Cat No. M-5655, Sigma) : DMSO (Cat No. D2650, Sigma)
Instrument	: ELISA Reader (Bio-Tex Instrument, Japan)

2) 세포독성 실험

Vero cell을 이용한 세포 독성실험 과정은 Fig. 2와 같다.

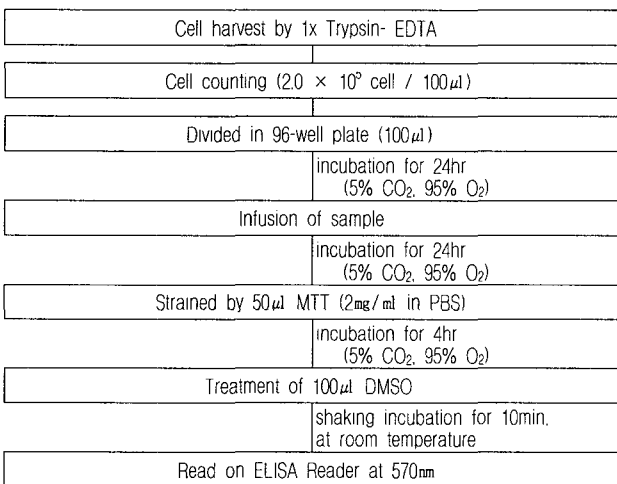


Fig. 2. Scheme of cytotoxicity test

3) 시험결과의 평가

시료처리 후 living cell을 MTT로 염색시킨 뒤, ELISA Reader를 이용하여 570nm에서 측정하였다. 측정된 O.D값을

control과 비교하여 cell viability %로 계산한다.

$$\text{cell viability} = \frac{\text{시료처리 cell O.D값}}{\text{control cell의 O.D값}} \times 100$$

실험결과

1. 각종 반하의 수분 및 회분 함량

생반하 및 포제과정을 거친 약재의 수분과 회분함량은 Table 2와 같다.

Table 2. Moisture and ash contents of the samples

Sample	Ingredient	Moisture(%)	Ash(%)
Banha		10.40	3.41
Kangbanha		9.50	3.20
Bubbanha		10.40	3.80
Jaebanha		8.50	4.00
Geokbanha*		6.70	4.40

* : Manufactured goods

생반하의 경우 수분함량이 10.40%이고 포제 후에는 수분함량이 6.70%~10.20% 범위로 생반하보다 감소되었다. 대한약전³⁰⁾의 기준치(14%이하)와 비교시 수분의 함량은 그 기준치에 적합하며 이 정도의 수분함량으로 보아 유통과정 중 변질 가능성은 적을 것으로 생각된다. 생반하의 회분함량은 3.41%였고 포제방법에 따라 다소 함량의 차이가 있어 3.20~4.40% 범위였다. 강반하의 경우 포제에 의해 회분함량이 감소되었고 범반하, 제반하 및 곡반하는 포제에 의해 그 함량이 증가되었다. 이는 포제시 들 어간 명반이나 생강에 의한 영향으로 생각된다. 회분함량을 대한약전³⁰⁾의 기준치(3.5%이하)와 비교시 본 연구에서 사용한 반하 증 강반하를 제외한 3가지 반하의 회분함량이 다소 높았는데 이는 약재의 출처나 포제방법에 따른 차이로 보여진다.

2. 추출에 따른 추출액의 수율 및 용매분획별 추출량

시료중량의 15배에 해당하는 70%-메탄올로 5시간 환류냉각 후 여과 및 원심분리하여 얻은 추출액의 총 수율은 Table 3과 같다.

Table 3. Total yield volume by the 70%- MeOH extraction

Sample	yield	Sample (g)	70%-MeOH volumn (ml)	yield (ml)	
				after filler	after centrifuge
Banha	Banha	300	4500	4080(90.66%)	3985(88.55%)
	Kangbanha	222	3330	3050(91.59%)	2860(85.88%)
	Bubbanha	300	4500	4175(92.78%)	3992(88.67%)
	Jaebanha	288	4320	3940(91.20%)	3600(83.20%)
	Kanbanha*	300	4500	4190(93.11%)	4030(89.56%)
	Bubbanha*	300	4500	4160(92.44%)	4050(90.00%)
Geokbanha*	300	4500	4210(91.50%)	3820(84.89%)	

* : Manufactured goods

연구하고자 하는 성분의 완전한 추출을 위해 약재 중량의 각각 9배, 6배의 용매로 2회 추출하였고 추출 온도는 처음 끓기 시작한 후 80 ~ 85℃로 세심히 조절하였다. 생반하와 이들의 포제품의 70%-메탄올 추출에 의한 추출액의 수율은 모두 90%이상

이었고 이를 다시 원심한 후에는 추출액 수율이 감소되었다. 위 결과들은 다른 약재를 이용한 연구보고 등과 같은 수준이었다³¹⁻³⁵⁾. 반하를 이용한 추출과정에서 가장 문제시 되었던 점은 약재의 특성상 점성 물질이 많이 함유되어 있었고 추출 잔류물이 너무 미세하여 여과가 힘들었던 점이었다.

Table 4에는 70%-메탄올로 추출하여 증발건조한 물질을 또 다시 4가지 용매로 분획추출하여 얻은 추출물의 중량과 그 비율을 정리하였다. 반하류 중 70%-메탄올에 추출된 extract의 함량의 수율은 곡반하가 13.81%로 가장 높게 나타났다. 총 extract량을 가지고 각 용매별로 추출하여 얻은 extract량을 조사한 결과는 모든 약재에서 일관성이 있었다. 즉 extract 수율은 물층, 클로로포름층, n-부탄올층, 에틸아세테이트층 순으로 높게 나타났다.

Table 4. Fraction contents of the samples by various solvent fractionation

Sample	Content	Sample (g)	Total extracts (g)	Sequential fraction extracts(g)				Loss (g)
				Chloroform	ethylacetate	n-butanol	water	
Banha	Banha	300	26.75 (8.91%)	1.40 (5.23%)	0.04 (0.15%)	0.33 (1.23%)	22.29 (83.38%)	2.69 (10.06%)
				Kangbanha	222	8.58 (3.86%)	0.33 (3.85%)	0.03 (0.35%)
	Bubbanha	300	4.61 (1.54%)	0.81 (17.57%)	0.03 (0.65%)	0.05 (1.08%)	0.84 (18.22%)	2.88 (62.47%)
	Jaebanha	288	10.20 (3.54%)	1.19 (11.67%)	0.14 (1.37%)	0.26 (2.55%)	5.70 (55.88%)	2.91 (28.83%)
	Kanbanha*	300	21.68 (7.12%)	0.84 (3.87%)	0.09 (0.42%)	0.67 (3.09%)	18.33 (84.55%)	1.75 (8.07%)
	Bubbanha*	300	25.55 (8.52%)	1.48 (5.79%)	0.15 (0.59%)	0.22 (0.86%)	22.46 (87.91%)	1.24 (4.85%)
	Geokbanha*	300	41.43 (13.81%)	1.19 (2.87%)	0.19 (1.19%)	1.03 (2.49%)	31.24 (75.40%)	7.78 (18.78%)

* : Manufactured good

3. HPLC에 의한 분석조건의 확립

Homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 분리조건을 찾아 보기 위해 이동상 용매를 여러 가지 조절하였다. Acetonitril 농도를 10%에서 90%까지로 달리하여 분석했을 경우 peak가 여러개로 분리되거나 retention time이 너무 빨라 분리능이 좋지 않았다. Methanol과 water 및 actic acid를 용매로 사용했을 때 H₂O : MeOH : CH₃COOH = 70 : 22 : 8 에서 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 peak는 분리능이 좋았으나 homogentisic acid peak가 예리하지 못하였다. 따라서 최종적으로 용매조건을 H₂O : MeOH : CH₃COOH = 57 : 35 : 8로 결정하였다. 최종 결정된 HPLC의 분석조건은 Table 5과 같다.

Table 5. Conditions of HPLC analysis for HA and 3,4-DBA

Solvent delivery system	: Sykam S-112 (Sykam, Germany)
Detector	: UV detector, Sykam S-3026 (Sykam, Germany)
Column	: μ-Bondapak C18, 10μ m (Waters, U.S.A.)
Mobile phase	: H ₂ O : MeOH : CH ₃ COOH = 57 : 35 : 8
Wavelength	: 280nm
Injection volume	: 20μl
Flow rate	: 0.7ml/min
Integrator	: Peak simple chromatography data system Model 202 (SRI, U.S.A)
Chart speed	: 0.5cm/min

HA : Homogentisic acid, 3,4-DBA : 3,4-dihydroxybenzaldehyde

4. HPLC에 의해 분석된 homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 함량

확립된 HPLC 분석조건에 따라 분석한 homogentisic acid, 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 함량은 Table 6과 같다.

Table 6. Contents of HA and 3,4-DBA in various samples

Sample	concentration ingredient	Fraction contents(μ g/sample 1g)				Total content (μ g/sample 1g)	Total content (mg/sample 100g)
		Chloroform	ethylacetate	n-butanol	water		
Banha	HA	4.76	1.02	5.21	99.34	110.33	11.03
	3,4-DBA	0.60	1.13	0.83	26.69	29.25	2.93
Kangbanha	HA	0.34	1.90	1.65	34.75	38.64	3.86
	3,4-DBA	0.60	4.05	0.35	1.85	6.85	0.69
Bubbanha	HA	0.09	0.02	0.21	36.80	37.11	3.71
	3,4-DBA	0.10	0.02	0.20	3.01	3.33	0.33
Jaebanha	HA	1.09	0.47	3.67	453.34	458.55	45.86
	3,4-DBA	1.77	1.11	2.01	17.30	22.19	2.22
Kanbanha*	HA	9.54	1.03	27.60	430.45	468.62	46.86
	3,4-DBA	2.87	1.04	7.44	3.07	14.41	1.44
Bubbanha*	HA	8.53	1.58	33.06	483.36	526.53	52.56
	3,4-DBA	3.17	1.92	5.55	46.85	57.49	5.75
Geokbanha*	HA	53.25	4.24	77.48	3089.73	3224.71	322.47
	3,4-DBA	15.55	8.88	18.36	53.44	96.23	9.62

HA : Homogentisic acid, 3,4-DBA : 3,4-dihydroxybenzaldehyde. * : Manufactured goods

생반하의 경우 homogentisic acid 함량이 반하 1g 중 110.33 μg 수준이었고 강반하와 법반하는 포제에 따라 그 함량이 감소되어 각각 38.64 μg, 37.11 μg이었으며 제반하의 경우 생반하 양의 약 4배 높은 농도인 458.55 μg이었다. 한편, 시중 유통품의 경우 강반하는 1g당 468.62 μg, 법반하는 526.53 μg, 곡반하는 3224.71 μg으로 분석되었다.

본 연구실에서 포제한 경우 강반하와 법반하에는 homogentisic acid 양이 포제에 의해 감소되었고 제반하는 증가하였다. 시중 유통품의 경우에는 원료 생반하의 함량을 알 수 없으므로 비교가 어려운 상태였으나 실험실에서 포제한 경우보다 homogentisic acid 함량은 매우 높은 상태였다. 생반하 및 그 포제품들의 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 함량도 homogentisic acid 함량과 같은 경향이었다

포제에 의해 천남성과의 독성은 감소된다고 보고되어 있듯이^{26,27)} 생강, 명반, 석회, 감초 등에 의해 포제를 한 약재의 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 함량은 감소되었다는 결과와 비교해 볼 때 본 연구결과에서 2가지 유독물질의 양이 포제에 의해 증가된 제반하의 경우 연구가 더 필요하다고 사료된다. 위 결과로 보아 포제과정에서 사용된 생강이 이들 성분의 농도를 낮추는데 어떤 효과를 발휘했다고 기대되며 이를 바탕으로 포제 과정 중 날짜에 따라 교환한 물에서도 이들 성분을 조사하여 본다면 포제 과정 중 유독성분의 변화를 알 수 있을 것이라 사료되며 향후 이 부분은 보충할 생각이다.

5. Vero cell을 이용한 독성 여부

Vero cell을 이용한 독성실험 시 열수추출물을 동결건조하여 사용하였다. 물에 녹지 않는 성분들이 있었지만 약재의 복용방법이 주로 물에 추출한 형태를 복용하기 때문에 본 연구에서는 수

고찰

용성 성분만을 독성시험에 사용하였다. HPLC에 의해서 정량된 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 양을 기본으로 하여 vero cell에 처리한 수준별 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 함량수준은 Table 7과 같다. 또한 Table 8에는 처리 농도별 세포생존율에 대한 결과를 정리하였다.

Table 8의 결과를 통해 cell viability를 이용하여 독성여부를 판단할 때, 생반하의 경우 0.25 μ l 이상 투여시 미미한 독성이 나타났고 포제과정을 거친 반하류에서는 생반하보다 그 독성이 적게 나타났다. 한편 본 연구에서 사용한 시중 유통품인 강반하, 법반하, 곡반하의 경우는 본 연구실에서 포제한 것들과 비교시 그 독성이 큰 것으로 나타났다.

수용성 부분을 가지고 독성시험을 거친 위 결과를 미루어 볼 때 질병치료에 사용하는 반하의 수준으로 만든 탕약을 1회 복용(150ml/pack)할 경우에 독성이 발현되지 않는 수준이라 판단되며 섭취횟수와 기간이 어느정도 인지에 따라 독성이 발현될 가능성은 있다고 판단되어진다. 향후 이 부분에 관한 독성실험과 수용성물질 이외의 분획에 대한 실험도 실시하여 그 독성물질의 총 독성 정도를 확인해야 할 것으로 더 많은 시간과 노력이 투자되어야 할 것이다.

Table 7. HA and 3,4-DBA contents in samples

Ingredient	Concentration	Infusion level			
		100 μ l	50 μ l	25 μ l	10 μ l
HA	Banha	0.346	0.173	0.086	0.035
	Kangbanha	0.121	0.060	0.030	0.012
	Bubbanha	0.116	0.058	0.030	0.012
	Jaebanha	1.437	0.718	0.359	0.144
	Kanbanha*	1.468	0.734	0.367	0.147
	Bubbanha*	1.650	0.825	0.412	0.165
	Geokbanha*	10.104	5.052	2.526	1.010
3,4-DBA	Banha	0.091	0.046	0.023	0.009
	Kangbanha	0.021	0.011	0.005	0.002
	Bubbanha	0.010	0.005	0.003	0.001
	Jaebanha	0.069	0.035	0.017	0.007
	Kanbanha*	0.045	0.023	0.011	0.005
	Bubbanha*	0.180	0.090	0.045	0.018
	Geokbanha*	0.301	0.150	0.075	0.030

HA : Homogentisic acid, 3,4-DBA : 3,4-dihydroxybenzaldehyde, * : Manufactured goods

Table 8. Effects of water extracts from samples on the vero cells[§]

Sample	concentration				
	100 μ l	50 μ l	25 μ l	10 μ l	
Banha	2.983 \pm 0.061 (92.64)	3.126 \pm 0.035 (97.08)	3.140 \pm 0.030 (97.51)	3.220 \pm 0.041 (100.00)	
Kangbanha	3.173 \pm 0.052 (98.54)	2.938 \pm 0.050 (91.24)	3.171 \pm 0.075 (98.48)	3.132 \pm 0.022 (97.27)	
Bubbanha	3.269 \pm 0.043 (101.52)	3.061 \pm 0.019 (95.06)	3.170 \pm 0.013 (98.45)	3.229 \pm 0.015 (100.28)	
Banha	Jaebanha	3.229 \pm 0.020 (100.28)	3.070 \pm 0.012 (95.34)	3.102 \pm 0.072 (96.34)	3.106 \pm 0.017 (96.46)
	Kanbanha*	2.869 \pm 0.015 (89.10)	3.092 \pm 0.043 (96.02)	3.108 \pm 0.020 (96.52)	3.207 \pm 0.045 (99.60)
Bubbanha*	2.883 \pm 0.028 (89.53)	2.869 \pm 0.015 (89.10)	2.951 \pm 0.023 (91.65)	3.011 \pm 0.014 (93.51)	
Geokbanha*	2.76 \pm 0.040 (85.71)	2.823 \pm 0.082 (87.67)	2.991 \pm 0.016 (92.89)	2.981 \pm 0.145 (92.58)	

Values are Mean \pm S.D. § : Not significant at p(0.05. () : Cell viability, %.
* : Manufactured goods

천연물을 이용한 한약은 수 천년전부터 인류가 이용하면서 축적한 방대한 정보를 체계적으로 정리하여 질병 예방 및 치료에 이용되고 있다. 그러나 질병 예방과 치료에 대한 동·서양의 시각차이가 뚜렷하여 동양에서는 陰陽五行의 원리를 바탕으로 하여 천인상응의 整體적 의학으로 계승 발전시켜 한의학 체계를 완성한 반면, 서양에서는 분석적 사고에 바탕을 둔 수술 및 약물 투여에 의해 치료기술로 발전하였다. 이러한 연유로 서양의학에서 동양의학의 범주에 넣고 있는 실정이다. 그러나 오랜 경험을 바탕으로 사용하고 있는 한약재는 약리효과와 문화적인 신념 때문에 동양은 물론 서양에서조차도 날로 사용량이 증가하고 있다. 이에 따라 각 나라의 행정부 산하 보건의로 관장기관 및 세계보건기구에서 식물성 약재 추출물의 투여가 국민의 건강에 위해성은 없는지 또는 효과가 어느 정도인지를 평가하여 생약의 품질 기준을 설정하기 시작하였다¹⁾.

천연물을 기원으로 하는 생약은 한방약, 민간약 혹은 한방제제의 원료나 식품의 감미료, 향료, 건강식품이나 기능성 식품 등의 원료로 매년 사용량이 증가되고 있다²⁾. 따라서 이들 천연약물의 품질을 이화학적으로 약효성분이나 특이성분을 지표물질로 정량분석하여 완벽한 품질평가를 위한 규격기준을 설정하여 품질을 표준화하는 연구는 매우 중요한 부분이다. 이와 더불어 이들의 안전성 확보차원에서 천연약물인 생약 및 약용식물의 안전성을 평가하는 것은 무엇보다도 우선되어야 할 과제이다.

안전성 평가는 한의학 연구 개발 범주 중 문헌, 진단, 물리치료기술 및 약제의 가공(포제) 연구를 제외한 실험약재의 함량 연구의 결과를 가지고 임상연구가 이루어져야 결과의 정확도와 효과를 기대할 수 있을 것이다. 이를 위해서 기존의 문헌적 고찰 결과와 잔류농약, 중금속, 곤충류 및 환경호르몬 등 위생분자와 세포를 이용한 독성실험이 진행되고 있다^{1,3,9-15)}. 그러나 한약재 적정사용량을 결정 할 수 있는 독성물질의 분리와 그 독성정도 및 처방약재의 환 또는 탕제로의 섭취시 가이드라인의 제시에 관한 연구 결과는 미약한 실정이다. 많은 수의 천연약물 및 식물을 거의 제한없이 한방진료 목적에 사용할 뿐더러 식용으로 섭취하는 우리 나라의 실정에 비추어 이들 천연약물의 약리적 효능, 독성 및 부작용 등을 계통적으로 연구하고 평가할 필요가 있다. 이런 평가과정은 한약재 특성에 맞는 기원별, 약용부위별, 산지별, 채취시기별, 재배방법에 따라 개별기준이 설정되어 장기간의 계획을 통한 모니터링 사업으로 축적된 결과를 통해 현실성 있는 기준을 근거로 이루어져야한다.

이에 본 연구에서는 한방임상의서로 활용되고 있는 方藥合編⁵⁾의 처방 중 활용빈도가 높고 한약재의 氣味에 有毒함이 보고된 반하를 연구대상 물질로 결정하였다.

반하는 天南星에 속한 다년생 본초인 *Pinellia ternata* (THUNB) BREIT.의 塊莖을 건조한 것이고, 성미가 辛溫有毒하며 燥濕化痰, 降逆止嘔, 消痞散結의 효능이 있다⁶⁾. 문헌적으로 반하는 神農本草經³⁶⁾ 下品에 “味辛平. 主傷寒, 寒熱, 心下堅, 下氣, 咽

喉腫痛, 頭眩風瘡, 咳逆腸鳴, 止汗"이라고 처음 기재되어 있다. 반하의 주성분은 자극물질(매운맛)이 약 0.01%, homogentisic acid, homogentisic acid glucoside, 3,4-dihydroxybenzaldehyde, 3,4-dihydroxybenzaldehyde diglucoside, alkaloid 등이 약 0.002%, ephedrine 및 아미노산이 0.08%, 당류로는 澱粉, D-glucose, L-rhamnose, D-glucuronic acid, 그 외에 β -sitosterol, β -sitosterol glucoside, choline, 精油(0.003-0.01%), 脂質, 粘液, 脂肪酸(0.85%), 灰分(1.9%) 등이 함유되어 있다³⁷⁾. 특히 이 약물은 有毒하므로 잘못 복용하였을 경우에는 중독 증상이 있게 되는데 초기에는 口, 舌, 咽喉에 灼痛感과 水腫이 생기고, 목이 쉬어 말이 안 나오거나, 嚥下困難, 言語不調, 味覺喪失, 惡心嘔吐, 胸悶腹痛 등의 증상이 있고, 중독이 심해지면 呼吸困難, 喉頭痙攣, 面色蒼白, 脈弱, 血壓下降 등이 나타나며, 최후에 이르러서는 四肢痙攣의 증상과 呼吸中樞가 마비되어 사망하게 된다. 중독 증상을 일으키는 주요 성분은 3,4-dihydroxybenzaldehyde, choline, homogenitistic acid 등으로 알려져 있다. 이러한 독성 부작용을 막기 위해서는 생반하를 3~4g 이상으로는 攝取하지 않으며, 일반적인 용량으로써 3~9g을 전탕해서 복용함이 마땅하고, 생으로 복용할 때는 生煎, 乾煎, 흑감초와 같은 불질을 配伍하여 생반하의 독성을 감소시키거나 없앤다. 또한 독성을 감소시키는 방법으로 포제하는 것이 가장 보편적인데 法半夏, 薑半夏, 淸半夏, 蘇半夏, 仙半夏, 宋半夏, 靑藍半夏, 竹瀝半夏, 半夏麩 등이 있고, 醋, 膽汁, 麩를 사용해 포제하기도 한다³⁸⁾.

본 연구에서 분석한 2가지 유독물질도 제반하를 제외하고는 모두 생반하보다 포제반하에서 그 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 제반하의 경우 homogentisic acid 함량이 증가되었는데 그 이유는 첨가물로 들어간 명반, 생강의 영향에 의해 hydroxybenzoic acid 구조에 어떤 치환반응이 일어났기 때문으로 생각되며 이 부분은 좀 더 연구를 해야 하겠다.

한편 시판되고 있는 반하류에서 유독물질 함량이 실험실에서 포제한 반하에서보다 높게 나타났는데 원래 생반하의 이들 물질 함량을 알 수 없어 포제가 잘 이루어 졌는지에 관해서는 언급할 수 없다. 그러나 본 결과를 통해서 시판제품의 품질관리 및 안전성 관리를 위한 가이드라인의 제시가 필요함을 인식 할 수 있겠다. 물론 시판 포제 반하류도 세포독성을 유발하지는 않은 수준으로 나타났으나 소비자의 섭취량이 얼마가 되는냐에 따라서는 독성유발가능성이 높을 수도 있다. 따라서 독성실험을 통한 자료가 하루빨리 구축되어 시중에 판매되고 있는 반하를 포함한 한약재의 유독물질 함량에 대한 안전한 범위는 꼭 제시가 되어야 할 것이다.

반하는 동물중에 따라 다양한 독성을 유발하는데, 특이한 것은 투여경로에 따라 독성에 있어 큰 차이를 보인다는 것이다⁹⁾. 즉 비경구투여시에는 대부분의 동물에서 상대적으로 낮은 용량에서 독성을 나타내지만, 경구투여시에는 수십 g/kg의 높은 용량에서만 독성이 발현된다. 전통적으로 생반하는 그 독성으로 인해 임신중에는 사용할 수 없는 대표적인 금기 생약재로 알려져 있어 외용으로는 사용되 내복으로는 포제하여 이용해 오고있다^{9,15,39-42)}. 이러한 이유는 독성을 나타내는 주요 성분의 하나가

단백질이라는 추론을 가능하게 하는데, 열처리 등의 과정을 통해 독성성분이 불활성화되지 않거나 경구투여가 아닌 주사제로 투여되는 경우에는 이들에 의해 임신초기에 유산을 일으키는 것으로 밝혀졌다^{9,39)}. 포제를 하지 않은 반하는 혀를 찌르는 듯한 열열하고 아린 맛을 가지며 비당질 부분은 강한 매운맛을 내고¹⁶⁾ 반하 물 추출물 역시 혀를 자극하는 성질을 띠고 있는데 이 자극성이 토끼와 같은 민감한 동물에서는 점막 손상을 일으키는 것으로 알려져 있어 저용량의 경구투여로도 독성이 나타나지만, 랫드나 마우스와 같은 설치류는 경구투여시 고용량에서도 거의 문제를 일으키지 않는 것으로 알려져 있다⁹⁾. 다만 암컷 랫드의 혈액학적 검사결과 neutrophils 및 lymphocytes의 증가에 따른 WBC 상승이 반하의 이러한 자극성에 기인할 가능성을 배제할 수 없다고 보고한 연구도 있다³⁾. 흥미롭게도 반하의 독성은 투여 경로에 따라 큰 차이를 보이는 것이 특징이다. Lee 등³⁾에 의해 수행된 랫드에서의 단회투여 독성평가에서도 최고 분할하여 투여가능한 5,000mg/kg까지 독성증상, 체중저하 및 사망을 초래하지 않았다. 또한 2,000mg/kg까지 고용량의 반하를 28일간 지속 투여했음에도 불구하고 투여 중 기도내 유입으로 인한 사망에 외에는 반하의 독성으로 인해 빈사상태에 빠지거나 사망한 동물이 발견되지 않았다. 따라서 반하의 주요 독성성분은 위장관에서 대부분 분해되거나 흡수가 제한되는 것으로 보인다고 해석하였다³⁾.

반하는 steroids, alkaloids, polysaccharides, phenolic compounds, proteins, amino acids 등으로 구성되어 있다¹⁷⁻²⁰⁾. 이들 중 일부는 다양한 약효를 나타내고 면역 보조제(adjutant)로서의 역할을 한다²²⁾. Protein 성분인 pinellin(banxia protein I) 결정체는 mitogenic activity를 가지는데, 토끼와 마우스에서는 lymphocytes의 유사분열을 촉진시키는 반면, 사람의 lymphocytes에는 작용하지 않는 것으로 알려져 있다^{43,44)}. 또 반하는 hepatic function에 영향을 미치는 것으로 알려져 있는바^{9,16)} 특히 수컷에서 albumin과 protein의 전반적인 상승이 유도되었고 더 나아가 pinellin은 양, 개, 고양이, 토끼, 기니피그, 랫드, 마우스 및 비둘기의 적혈구는 응집시키지만, 사람, 원숭이, 돼지, 닭, 오리, 거위, 거북이, 두꺼비, 뱀장어 등의 적혈구는 응집시키지 않는 것으로 알려져 있는데^{21,23)} 이는 혈구막이나 혈장 성분에 영향을 미치기 때문으로 생각된다. 또한 혈청 phosphorus와 calcium이 전반적으로 상승하는 현상이 관찰되는데 이러한 원인을 뒷받침해 줄 수 있는 과학적인 연구결과는 현재까지는 찾아볼 수 없다. 따라서 13주간의 장기간 반복투여 독성시험이나 성분별 독성기전 연구를 통해 규명되어야 할 것으로 사료된다. 흥미롭게도 Lee 등³⁾의 연구에서 암컷 랫드에서 난소 중량이 감소하는 경향을 나타내었다. 비록 조직병리학적 소견에서 이렇다 할 병변을 관찰할 수는 없었지만, 미성숙 랫드를 이용한 pubertal onset assay 결과 질개구 일령(vaginal opening time)이 지연되었고 성숙 랫드에서도 발정휴지기(diestrus)가 연장되었는데 이는 반하의 antiestrogenic activity 때문으로 여겨진다. 비록 반하의 일반 독성 및 생식에 대한 영향이 비경구투여시에는 잘 발현되지만 경구투여시에는 나타나지 않는 것으로 알려져 있는데, 반하 성분의 생식독성에 관해서는 cabergoline alkaloid, D-methyl

phenidate, phthalates, phytoestrogens, D,L-methyl phenidate, diepoxy butane, emtricitabine 등의 물질이 연구되었지만, 심각한 생식독성은 단백질 성분에 의해 유발되는 것으로 보인다^{9,39-42,45}). 이러한 보고로부터 판단할 때 2,000mg/kg까지의 고용량을 장기간 투여했을 때에도 심각한 독성이 발현되지 않은 것은 임상경로를 적용했기 때문으로 사료된다. 특히 경구투여에 의한 독성성분의 불활성화는 물론 crude extracts의 투여액량의 한계 및 독성성분의 함량 등도 독성을 나타내지 못한 원인이라 생각된다. 비록 경구투여시에는 위내 효소에 의한 단백질 등의 분해로 설치류에서는 독성이 거의 초래되지 않는 것으로 알려져 있으나, 토끼 등 고등동물은 설치류에 비해 훨씬 민감하며⁹, 특히 위기능 장애가 있는 환자나 고용량, 장기간 또는 비경구로 노출될 경우 등 다양한 조건에서의 부작용 가능성을 배제할 수 없다. 더욱이 천연물로부터의 생리활성물질 탐색 및 개발을 전제로 할 경우 crude extracts의 투여량의 한계나 투여경로와는 달리, 반하의 정제된 약리활성 성분을 미량으로 또는 비경구 경로로 투여할 가능성이 높으므로^{9,39} 동물종 및 투여경로에 따른 독성에 대한 세밀한 재평가가 요구된다 하겠다.

여러 연구자들의 반하독성실험에서 그 결과는 매우 다양하게 제시되고 있어 객관화된 peer review가 어려운 상태이다. 이는 독성실험에 사용한 한약재의 전처리 과정이 확실하지 못하고 잘못된 또는 일부분의 추출분획만을 이용하여 생긴 결과이다. 따라서 독성시험의 방법론이나 독성시험에서 일관된 시료의 사용에 관한 통일된 내용이 제시되어야만이 인정받는 독성시험을 실시할 수 있을 것이다. 이런 취지에서 본 연구는 반하 유독성분의 정량 방법을 확립하고 생반하 및 포제 반하의 독성 물질 함량을 분석하여 독성 실험에 있어 용량 설정 및 실험설계를 위한 기초자료와 임상에서 약제사용에 대한 가이드라인을 제시하는데 기초자료가 될 수 있으리라 사료된다.

결 론

본 연구는 한약재에 대한 모니터링 사업의 일환으로 장기간의 체계적이고 반복적인 연구를 통해 한약재의 안전성 평가를 위한 기초자료를 수립하는데 그 목적이 있고 1차적으로 반하의 유독성분인 homogentisic acid와 3,4-dihydroxybenzaldehyde의 HPLC에 의한 분석법 확립 및 정량을 실시하였다. 생반하와 각종 포제반하의 유독물질의 정량방법을 확립하였고 포제에 의해 유독물질 함량이 감소됨을 확인하였으나 시판되고 있는 포제 반하들의 유독물질 함량은 본 연구실에서 포제한 반하의 양보다 높음을 알 수 있었다. 또한 통상 임상에서 사용되어지는 양으로 환산하여 탕제나 환으로 처방을 복용시 섭취되어지는 양을 계산하여 세포독성실험을 실시하였을 때 1회 150ml의 탕제를 섭취하는 정도로는 독성이 거의 없는 수준이라 판단되나 처방의 섭취횟수와 기간에 따라 독성이 발현될 가능성은 있다고 판단되어진다.

위 결과는 국내산 한약재의 품질관리를 통하여 안전성 확보 및 국제신뢰도제고, 한약재 중 위해 물질에 대한 과학적 근거제

시로 안전성에 대한 소비자 인식 전환의 기초자료제공 및 품질평가 및 한약제제 사용시 가이드라인 제시 등 정책적 측면에 효과를 바랄 수 있겠다. 또한 유독성분의 분석법 확립, 유독성분의 사용기준 및 규격 제정과 식물유해 독성성분의 안전성 평가 자료를 제공하는 기술적 측면의 성과도 기대될 수 있겠다고 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2002년도 독성물질의 국가관리체계구축사업(Korean National Toxicology Program, 식품의약품 안전청, 국립독성연구원)으로 수행된 결과의 일부이며 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

1. 식품의약품안전청, 기능성식품의 합리적 관리체계 구축을 위한 연구, 식품의약품안전청, 서울, 2002.
2. 박용구, 한방정책의 현재와 미래, 한국한의학연구원 국제 학술 심포지움, 1998.
3. Lee, J.E., Kim, H.J., Choi, E.K., Chai, H.Y., Yun, Y.W., Kim, D.J., Nam, S.Y., Lee, B.J., Ahn, B.W., Kang, H.G., Kim Y.B. Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia extract, The Korean Journal of Laboratory Animal Science 19(3) : 127-141, 2003.
4. 식품의약품안전청, 식품공전(고시 제2000-18호), 식품의약품 안전청, 서울, 2002.
5. 황도연, 방약합편, 남산당, 서울, 1992.
6. Kurata, K., Takaaki, T., Ye, Y., Kaoru, K., Kiyotaka, K., Kunio, T., Kazuo, W., Yoshiki, N., Quantitative analysis of anti-emetic principle in the tubers of Pinellia ternata by enzyme immunoassay, Plant Med 64 : 645-648, 1998.
7. Naki, T., Takahashi, K., Shibata, S., An antiemetic principle of Pinellia ternata Tuber, Plant Med 53 : 410-414, 1987.
8. Park, J.H., Effects of Pinellia ternata tuber on the emetic and sedative action of xylazine hydrochloride in cats, Korean J Vet Res 32 : 341-345, 1992.
9. 곽소장 편저, 유독중초약대사전, 천진과기번역출판공사, 천진, pp.192-197, 1992.
10. Kasahara, Y., Saito, E., Hikino, H., Pharmacological actions of Pinellia tubers and Zingiber rhizomes, Shoyskugaku Zasshi 37 : 73-83, 1983.
11. Chang, H.M., But, P.P.H., Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica, World Scientific Co., Shanghai, pp.439-446, 1986.
12. 생약학연구회, 현대생화학, 광학사, 서울, pp.460-462, 2000.
13. Wu, K.Z., Tao, Z.J., Isolation and characterization of a trypsin inhibitor from the rhizome of Pinellia ternata, Acta Biochim Biophys 13 : 267-274, 1981.
14. 국가중의약관리국, 주화본초, vol 8, 상해과학기술출판사, 상

- 해, pp.513-520, 1999.
15. 이정원, 강병수, 한방임상을 위한 한방포제와 응용, 영림사, 서울, pp.195-199, 1988.
 16. Suzuki, M., Irritating substance of *Pinellia ternata*, *Arzneimittelforschung* 19 : 1307-1309, 1969.
 17. Chung, S.H., Um, J.Y., Kim, M.S., Hong, S.H., Kim, S.H., Kim, H.K., Park, S.J., Kim, S.C., Hwang, W.J., Kim, H.M., Determination of the site of origin of *Pinellia ternata* root based RAPD analysis and PCR-RELP, *Hereditas* 136 : 126-129, 2002.
 18. Murakami, T., Nagasawa, M., Itokawa, H., Inatomi, H., Water-soluble constituents of crude drugs. I. Free amino acids isolated from tubers of *Pinellia ternata* and *Arisaema ringens*, *Yakugaku Zasshi* 85 : 832-835, 1965.
 19. Oziki, S., Constituents of *Pinellia ternata*. II. Sterol and bases of *Pinellia ternata*, *Yakugaku Zasshi* 81:1706-1708, 1961.
 20. Oziki, S., Constituents of *Pinellia ternata*. III. Steryl glucoside of *Pinellia ternata*, *Yakugaku Zasshi* 82 : 766-768, 1962.
 21. Sun, C., Zu, J.H., Zhai, S.K., Tao, Z.J., Yan, T.Y., Zhu, Z., Shen, Z.W., Some biological properties of pinellin, *Acta Biochim Biophys* 15 : 333-338, 1983.
 22. Nagai, T., Kiyohara, H., Munakata, K., Shirahata, T., Sunazuka, T., Harigaya, Y., Yamada, H., Pinellin acid from the tuber of *Pinellia ternata* Breitenbach as an effective oral adjuvant for nusal influenza vaccine, *Int Immunopharmacol* 2 : 1183-1193, 2002.
 23. Tao, Z.J., Xu, Q.Y., Wu, K.Z., Kian, S.H., Sun, D., Isolation, crystallization, biological activities and some chemical characteristics of pinellin. In : *Nucleic acids, proteins*, Science Peking, pp.123-126, 1980.
 24. Yajima, M., Ozeki, S., Constituents of *pinellia ternata*, *Bull Nagoya City Univ Pharm School* 50 : 37-41, 1961.
 25. Kim, S.H., Jeong, H., Kim, Y.K., Cho, S.H., Min, K.U., Kim, Y.Y., IgE-mediated occupational asthma induced by herbal medicine, *Banha, Clin Exp Allergy* 31 : 779-781, 2001.
 26. 김기영, 송호준, 한약포제학, 신일상사, pp. 534-536, 2002.
 27. 안덕균, 김호철, 한약포제학, 아중사, pp. 70-78, 2000.
 28. 식품공업협회, 식품공전, 문영사, 서울, pp. 541-548, 2001.
 29. Park, J.S., Park, J.H., Lee, B.C. Effect of extraction procedures on chemical composition and physical properties of *Lycii Cortex*, *Korean J Medicinal Crop Sci* 6(2) : 91-95, 1998.
 30. 보건복지부, 대한약전, 사단법인 대한보건공정서협회, 서울, pp. 843-844, 1987.
 31. Han, J.H., Baek, S.H., *Pinellia ternata*로부터 homogentisic acid의 함량분석, 식품의약품안전본부, 서울, pp. 73-90, 1997.
 32. Czaplá, T.H., Claeys, M.R., Morgan, T.D., Kramer, K.J., Hopkins, T.L., Hawley, M.D., Oxidative decarboxylation of 3,4-dihydroxymandelic acid to 3,4-dihydroxybenzaldehyde: electrochemical and HPLC analysis of the reaction mechanism, *Biochimica et Biophysica Acta* 1077:400-406, 1991.
 33. Gata, S.S., Ishihara, S., Wantanase, Y., Nagata, Y., Matsushima, Y., A chemical model of catechol-O-methyltransferase. Methylation of 3,4-dihydroxybenzaldehyde in aqueous solution, *Chem Pharm Bull* 37(5) : 1143-1146, 1989.
 34. Yang, Y.H., Kim, Y.J., Chung, H.Y., Peroxynitrite and hydroxyl radical scavenging activity of dihydroxybenzaldehydes, *Korean J Gerontol* 11(3) : 24-28, 2001.
 35. Hipeli, S., Elstner, E.F., OH-radical type reactive oxygen species : a short review on the mechanisms of OH-radical and peroxynitrite toxicity, *Z Naturforsch* 52C:555-563, 1997.
 36. 神農本草經, 과학기술문헌출판사, 북경, pp. 92-93, 1996.
 37. 김형균, 김형민, 송봉근, 이언정, 정현택, 한약의 약리, 고려의학, 서울, 2000.
 38. 왕효수 : 역대중약포제법사전, 강서과학기술출판사, 강서, pp. 59-67, 1989.
 39. Xia, L.N., Li, C.J., Effects of *Pinellia ternata* Breitenbach protein on the termination of early pregnancy in mice and its action mechanism. *Acta Acad Med Primae* 12 : 193-198, 1985.
 40. Steve, K.T., David, O.S., Steve, D.T., Alan, M.H., Mildred, S.C., Vikram, D.K., The perinatal and postnatal toxicity of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in rats, *Reprod Toxicol* 16 : 353-366, 2002.
 41. George, M.S., Laurene, H.W., John, P.W. and Frank, S.R., Reproductive toxicology profile of emtricitabine in mice and rabbits, *Reprod Toxicol* 17 : 95-108, 2003.
 42. Diana, B., Monica, L., Guy, M., Reproductive toxicity of cabergoline in mice, rats and rabbits, *Reprod Toxicol* 10 : 471-483, 1996.
 43. Shoyama, Y., Hatano, K., Nishioka, I., Rapid and simple multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture, *Plant Med* 47 : 103-105, 1983.
 44. Shoyama, Y., Hatano, K., Nishioka, I., Clonal multiplication of *Pinellia ternata* by tissue culture, *Plant Med* 49:14-16, 1983.
 45. Marcello, S., Eugenia, C., Giorgio, L. and Francesca, P. Diepoxybutane cytotoxicity on mouse germ cells is enhanced by in vivo glutathione depletion : a flow cytometric approach. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 397 : 37-43, 1998.