

## 乾漆 추출물(Nexia)의 Quality Control을 위한 기시범 및 안정성 연구

윤성우<sup>\*\*\*\*</sup> · 박상재<sup>\*\*</sup> · 김경석<sup>\*\*\*</sup> · 정현식<sup>\*\*\*</sup> · 최원철<sup>\*\*\*</sup>

\*경희대학교 한의과대학 한방내과 · \*\*AZI(주) · \*\*\*경희대학교 동서신의학병원 통합암센터

### The Study on the Process and Quality Control of *Rhus Verniciflua Stokes* Extract (Nexia)

Seong-Woo Yoon\*, Sang-Jae Park\*\*, Kyung-Suk Kim\*\*\*, Hyun-Sik Jung\*\*\*, Won-Cheol Choi\*\*\*.

\* Department of Oriental Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University, Korea

\*\* AZI company

\*\*\* MU Integrative Cancer Center, East-West Medical Center, Kyung Hee University, Korea

*Rhus Verniciflua Stokes* has been used for long history to treat blood stasis and cancer in Oriental Medicine. But urushiol, a constituent of *Rhus Verniciflua Stokes* has T-cell mediated allergic reaction, so it has made clinical limitation. Nexia is allergen removed extract of *Rhus Verniciflua Stokes* and its extraction process as well as quality control is needed to be standardized. The optimized extraction condition is as follow; temperature is 90~95°C, volume of slovent 10 times, extraction time >6 hours, pressure <1kg/cm<sup>2</sup>, slovnet water or EtOH(60%), yield 8.1~9.8(w/w). HPLC pattern and isolation study showed Nexia contain fisetin(>13.0%), fustin(>7.0%) and no urushiol.

## I. 서 론

종양은 조직의 자율적인 과잉성장으로 개체에 의의가 없거나 이롭지 않고 정상 조직에 대해서 파괴적인 것으로, 임상 및 병리 형태적인 소견에 의해 양성종양과 악성종양으로 구분된다.<sup>1)</sup> 양성종양은 비교적 서서히 일정한 속도로 성장하며 신체 여러 부위에 확산 즉 전이를 일으키지 않을 뿐 아니라 제거하면 완전히 치유될 수 있다. 이에 반해 악성종양은 불규칙하고 빠른 성장을 하며, 침윤성 혹은 침입성 성장으로 주위 정상조직을 파괴하고 체내 여러 부위로 확산 및 전이를 일으켜 정상세포를 파괴하므로 생명을 위협한다. 진행성 암의 경우 타 장기에 원격 전이가 되는데 수술요법, 항암요법 및 방사선요법의 한계가 있다.

한의학에서 악성종양은 다양한 병증으로 인식되어 왔는데 위암은 噎膈, 反胃로 유방암은 妒乳, 乳巖으로 갑상선암은 石癭과 失榮으로 자궁암은 癥瘕, 崩漏 등으로 표현되었다<sup>2)</sup>. 백혈병은 瘟毒, 衄血, 虛勞, 血痺의 범주에 속하는데<sup>3)</sup> 한<sup>4)</sup>, 김<sup>5)</sup>, 최<sup>6)</sup> 등은 痞氣丸, 伏梁丸과 大棗, 冬蟲夏草, 無花果, 鱉甲, 側柏葉, 補骨脂를 백혈병 세포에 대한 항암실험을 통해 유의한 효과를 보고 하였고, 孫<sup>7)</sup> 등은 益氣養陰解毒湯을 급성 골수성 백혈병 환자에게 활용하여 65.4%의 증상 호전을, 김 등<sup>8,9)</sup>은 가미계격탕이 폐암에 부작용이 없으며 유효한 항암효과를 보였다고 보고하는 등 암의 예방과 치료를 위한 한약 연구가 증가하고 있다.

옷(乾漆)은 한의학에서 性味が 辛溫鹹하고 肝脾胃大小腸으로 歸經하며 주로 血分에 작용하여 破血하고 胃腸의 積滯를 消散시키므로 주로 瘀血, 積聚, 癥瘕 및 冷心痛 등에 주로 활용되어 왔으며, 최근 암치료 활용 가능성이 제기되었다<sup>10)</sup>. 그 후 옷나무 추출물 및 성분이 실험적으로 세포종식억제, 면역증진 및 항산화 작용 등이 있다고 보고되었다<sup>11)</sup>. 그러나 옷나무

의 주요성분인 urushiol이 유발하는 T 세포 매개성 면역반응은 옷나무 추출물의 임상적 응용에 많은 제약을 주는 부분이 되었다.

본 연구에서는 urushiol을 특수한 방법으로 제거한 후 옷나무 껍질 (*Rhus verniciflua* STOKES)을 고압상태에서 열처리 한 옷나무 추출물(Nexia; 특허 제0394089 /제0504160)을 한방 항암치료제로 개발하고자 하는 의도로 먼저 Nexia의 표준화를 위해 제조공정에 따른 수율과 성분분석, 안정성, 기시법의 연구에 대한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 연구방법

### 1. 옷나무 추출물(Nexia)의 제조방법과 최적조건 평가

본 실험에서 사용한 옷나무는 대한민국 강원도 횡성지역에서 재배된 것으로 수령 10년에서 15년생을 채취하여 건조 후 사용하였으며 알리지 유발특성의 제거는 대한민국 특허 0504160에 기재된 방법에 의하여 처리하여 Nexia를 만들었다. Nexia 추출물의 제조는 추출조건과 사용 용매에 따라 조성 및 수율이 현저히 달라진다. 따라서 조건에 따른 추출물의 수율의 변화와 용매 분획에 따른 수율을 조사하였다. 수율은 제품의 가격을 결정하는데 가장 중요한 인자이므로 추출물의 수율은 옷나무 입자의 크기, 추출 용매, 용매의 부피, 온도, 압력, 시간에 따른 조건으로 비교하여 최종적인 추출조건을 결정하였다.

### 2. Nexia의 용매분획 및 구조동정

옷나무 추출물(Nexia)의 주요성분을 분리정제하고 구조를 동정하기 위하여 일반적인 분획법에 준하여, 에탄올 용해부분을 분리하고 불용성

물질을 제거한 다음 다시 에탄올을 제거하고 물에 용해 후 이를 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄놀 용매의 순서로 순차적으로 분획하여 분획물을 제조하였다. Nexia의 주요성분은 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 이용하여 pick 존재 유무를 통하여 확인하였다.

### 3. 순수물질의 분리, 동정 및 구조

분획물로부터 순수정제하기 위하여 실리카(Merk Co., 70-230 mesh) 컬럼 및 Sephadex LH-20을 충전제로 사용하였다. NMR은 경희대 농대 공동기기실의 VARIAN 400 모델 (Unity Inova 400 STNMR Spectrometer, USA)를 사용하였으며 용매는 CD3OD를 사용하였다.

## III. 결 과

### 1. Nexia의 제조수율 및 최적조건

#### 1) 추출용 윗나무 입자의 크기가 수율에 미치는 영향

윗나무 추출물의 전체적인 scale-up의 과정은 그림1과 같다. 윗나무 추출물은 매쉬를 이용하여 선별하는 것이 가장 이상적이나 지나치게 미세하게 하는 것은 추후 scale-up시 적용이 불가능한 경우가 많아 본 연구에서는 현실적으로 가능한 입자의 크기를 전제로 적용하였다. 일반적으로 입자의 크기가 작을수록 추출 수율은 증가하게 된다. 본 연구에서는 현실적으로 적용 가능한 입자크기를 만드는 방법으로 윗나무 톱밥을 선택하였다. 톱밥의 크기는 칩상(chip shape)과 비교하여 통상적으로 얻어지는 톱밥(sawdust shape)으로 하였다. 칩상과 톱밥상은 각각 2%와 8.1%로 수율이 나타나 톱밥상 추출물의 수율이 칩사에 비해 4배정도 좋은 것으로 나타났다.

추출에 적용한 조건은 추출온도는 90-95 ℃,

용매의 배수는 10 배수, 시간은 6 시간으로 하였다. 이러한 추출조건의 결정은 이미 사전 연구에서 일부 진행된 부분이 있으며 가장 결정적인 영향을 미치는 것은 추출물의 입자의 크기이므로 이를 확인하고자 하였다. 따라서 상기의 결과로부터 입자의 크기는 현실적으로 가능한 톱밥을 최상의 원료로 결정하였다.

추출효율을 높이는 방법의 한가지로 추출 횟수를 늘 수 있는데 본 연구자들은 추출횟수를 대량생산을 기준으로 2회까지 추출하는 것을 전제로 하여 횟수별 추출수율을 조사하였다. 그 결과 전체 추출물을 대상으로 할 경우 1차 추출에서 80%, 2차 추출에서 20%가 얻어지는 것으로 나타났다. 3차 추출의 경우 얻어지는 추출물의 양이 너무 적어 경제성이 없는 것으로 나타났다. 따라서 추출횟수는 2회로 결정하였다.

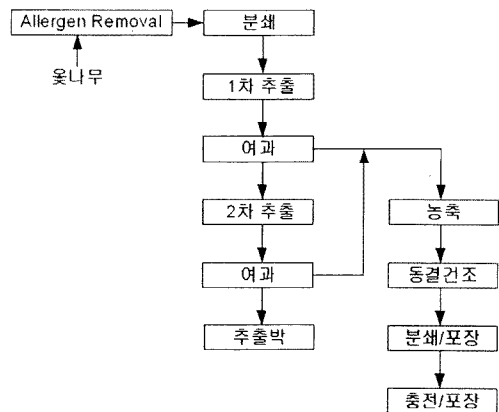


Fig. 1. Scale-up Process of Nexia

#### 2) 온도별 추출정도의 비교

각 온도에 따른 추출물의 추출정도를 비교하였다. 온도는 40, 60, 80, 100 ℃에서 시간별 추출정도를 흡광도로 비교하여 측정하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이 최적의 추출시간은 추출온도에 따라 달라지며 80~100 ℃의 경우 적절한 추출시간은 4시간이 가장 적절한 것으로 사료된다.

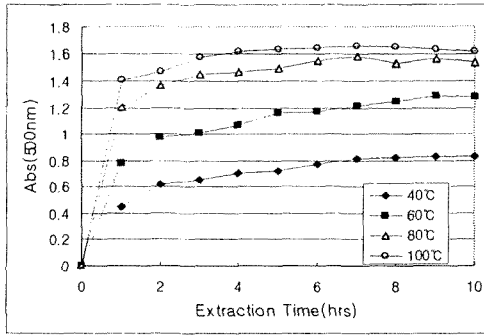


Fig 2. Extraction profile at different extraction temperature.

### 3) 추출 용매에 따른 추출 수율의 비교

용매에 따른 추출수율의 비교를 위하여 용매를 주정을 기본으로 하여 희석정도를 변경하면서 추출하였다. 추출물은 식품원료로 사용되는 것이므로 주정을 기본으로 하였으며 상대적인 참고자료로 활용하기 위하여 통상적으로 천연물의 추출에 사용되는 조성인 메탄올 80%(v/v)를 동시에 비교하였다. Fig. 3에서 나타난 바와 같이 추출수율은 40%와 60% 에탄올에서 가장 높게 나타났으며 추출시간을 고려한다면 60% 에탄올에서 가장 효율적이라고 판단할 수 있다. 특히 100% 에탄올에서 추출수율이 현저히 낮은 것은 친수성의 물질들이 추출되지 못함으로 해서 전체적으로 수율이 떨어진 것이라고 보인다.

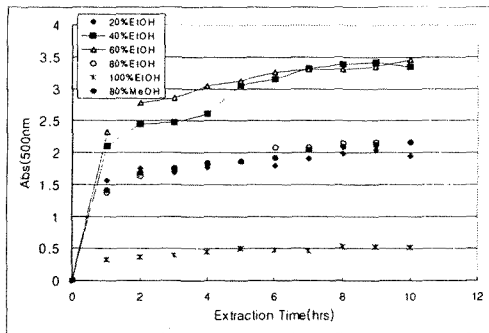


Fig. 3. Extraction profile at different ratio of BuOH

### 4) 입자의 크기별 추출 수율과 최적 추출조건

옷나무 입자를 크기별로 분쇄하여 추출수율을 비교한 결과 예상과 같이 입자의 크기가 작을수록 추출 수율은 올라갔으며 입자의 크기가 클 경우 8~10 시간 정도 추출 후 수율은 입자의 크기가 작은 경우와 유사한 결과를 보였다. 이는 예상할 수 있는 결과로 현장에서는 설비의 어려움으로 무한정 입자를 적게 하는 것이 어려우므로 적절한 크기로 하고 추출시간을 연장하는 것이 바람직함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 바탕으로 최적의 추출조건을 결정하였다. 최종적인 수율은 톱밥상으로 물 추출할 경우는 8.1%(w/w)이고 톱밥상으로 60% 주정 추출할 경우는 9.8%(w/w)로 측정되었다. 온도는 90~95°C, 용매 부피는 10배수, 추출회수는 2회, 압력은 1기압이하, 추출시간은 6시간정도, 원료성상은 톱밥이며 사용 용매로는 물 또는 60% 에탄올을 사용하는 것이 바람직한 것으로 사료된다(표 1).

Table 1. Optimized Extraction Process of Nexia

Items	Conditions	Others
Temperature(°C)	90~95°C	Water Extraction
Volume of Solvent	10 times(v/w)	
Extraction Times	Twice	3 <sup>rd</sup> Ext'n(Yield 3% up)
Extraction Time	>6 hours	6~24hours
Pressure	<1Kg/Cm <sup>2</sup>	
Shape of Raw material	Saw dust	
Solvent	Water or EtOH(60%)	
Yield(%)	8.1~9.8%(w/w)	Raw material dependence

## 2. Nexia의 용매분획 및 구성성분 확인

Nexia의 용매분획은 Fig. 4와 같은 분획과정을 통해 얻어진 분획은 원추출물(A), CHCl<sub>3</sub> 분획(B), Ethylacetate 분획(C), n-butanol 분획(D), 물분획(E)으로 구분하였고 각 분획에서 얻어진

분획물의 양을 표시하였다. 이중 에틸아세테이트 분획이 37.2% 수율로 가장 많았다. 각 분획의 HPLC 패턴은 Fig. 5에 나타난바와 같이, 지금까지 알려진 물질로서 옷나무에 가장 많이 함유된 것은 fustin이며 그 외에 fisetin, sulfuretin, butein 등이 있다. 이들 물질의 표준물질을 구하여 HPLC로 분석한 결과와 비교하여 동일한 위치에서 얻어진 것을 우선적으로 그 물질로 추정하였다. 대부분의 지표물질로 여겨지는 플라보노이드는 에틸아세테이트 분획에 존재하였다.

Nexia의 구성성분으로 알려진 urushiol, fustin, fisetin, sulfuretin 및 butein의 잔존 여부는 HPLC를 이용하여 피크 존재여부로 판단하였다. 우루시올의 분석에 사용된 HPLC는 Shimadzu LC-10A w/ two pumps and autoinjector을 사용하였으며, YMC-pack ODS-A, S-5 $\mu$ m, 12nm, 250x4.6mm I.D.의 column표를 사용하였고, 시료는 20 $\mu$ l을 40 $^{\circ}$ C에 처리하였고, urushiol은 mobile phase로 methanol:water=85:15, flow rate는 1.2ml/min으로 하였으며, flavonoid는 mobile phase로 phosphate buffer20mM(pH=3):methanol:THF=5:3:2methanol: water=85:15, flow rate는 1.0ml/min으로 하였다.

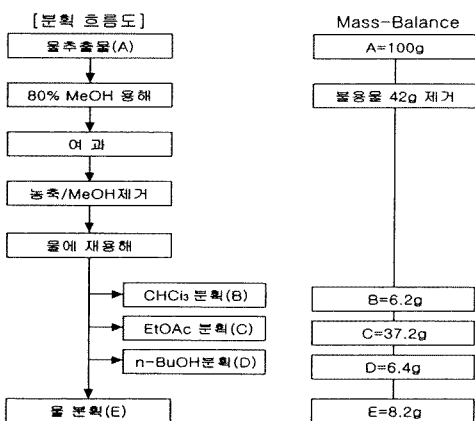


Fig. 4. Schematic diagram of fractionation of Nexia.

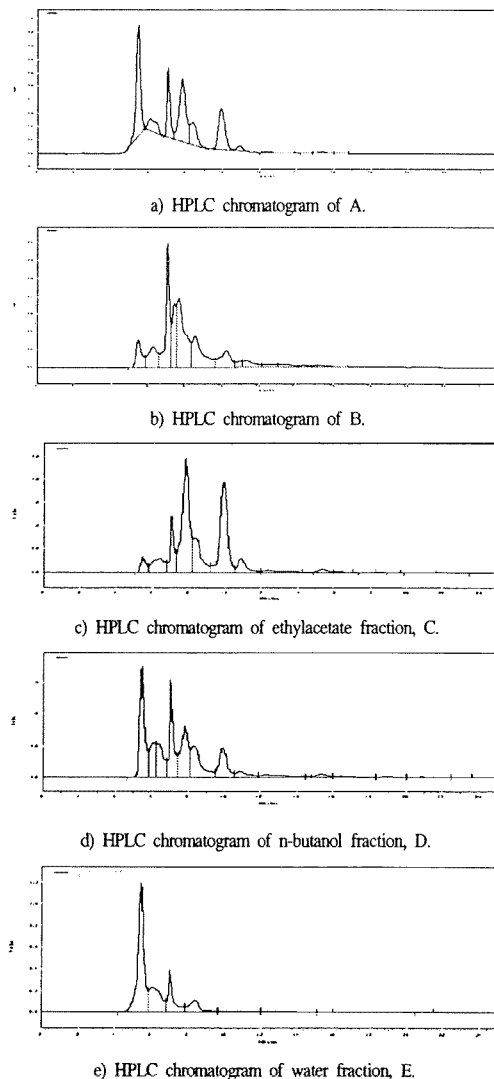


Fig. 5. HPLC pattern of each solvent fraction of Nexia

### 3. 순수물질의 분리, 동정 및 구조결정

Fig. 6에 나타난 RVC-4-1 및 RVC-2-2-3-1을  $^1$ H,  $^{13}$ C, NMR을 이용하여 동정한 결과 RVC-4-1은 2,4-dihydroxybenzaldehyde이며, RVC-2-2-3-1은 sinapyl aldehyde로 동정되었다 (Fig 7). 동일한 방법으로 ethylacetate 분획을

분리 정제하여 fustin, fisten, sulfuretin을 각각 동정하였다. 이들 물질은 앞선 연구에서 알려져 있는 물질이다. 이들 물질의 표준시약을 구입할 수 있어 이를 별도로 HPLC를 이용하여 그 순도를 측정한 결과 95% 이상으로 높은 순도로 분리되었음을 알 수 있었다.

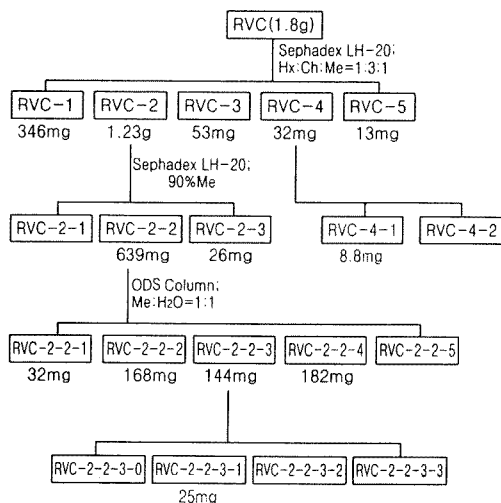


Fig. 6. Isolation scheme of effective compounds from CHCl<sub>3</sub> fraction of Nexia

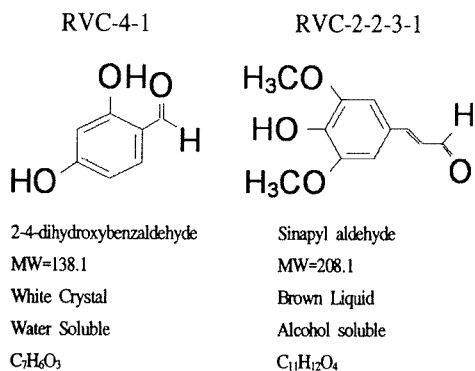


Fig. 7. Identification from CHCl<sub>3</sub> fraction

## IV. 고찰 및 결론

옷은 乾漆이라고 하며 생약명은 Laacca Sinica Exsiccata고 漆, 漆渣, 漆低, 漆脚이라고 불리기도 한다. 여름에 옷나무의 莖幹과 樹皮 위에 刺像을 입혀 흘러나오는 樹脂를 건조한 것으로 漆桶 안에 남은 漆脚을 취하여 햇볕에 말린 후 깨끗한 乾漆을 부스러뜨려 밀폐된 용기 안에서 가열해 불을 끄고 식으면 부셔서 약용으로 쓰며 밀폐해 보존하고 불을 피한다. 주 성분은 生漆 속의 urushiol이 laccase의 작용으로 공기중에서 산화되어 생성된 검은색의 renin樣 물질이다.

옷은 주로 치료하는 病症인 血積과 疝瘕의 병리적 소견을 역대문헌을 통해 살펴본바 양방적으로 胃, 腸, 肝, 膽, 脾, 骨盤 및 腹膜後의 腫物을 포함하는 腹腔內의 腫物과 유사한 개념으로 인식되어 암치료 활용 가능성을 시사하고 있다<sup>10</sup>.

만성 질환과 통증에 사용되던 乾漆(Rhus Verniciflua)은 한의학에서는 어혈 치료제로 활용되어오던 한약제로 '건칠', '생칠', '칠피'라고 불리우기도 하였으며, 전통적으로 구충효과, 어혈치료 효과, 종양치료 효과 그리고 위질환(위염 및 위궤양)치료에 효과가 있는 것으로 알려져 왔다<sup>10-12</sup>. 본 실험에 활용한 Nexia는 이 약재를 한 번 더 알려지 성분을 제거하고 항암효능이 높도록 제조한 천연물 유래 약제이다.

Nexia는 1996년부터 관절 및 여성질환(근중), 양성질환 및 통증에 사용되어 왔고, KAIST 및 여러 대학 등에서 항암효능이 발표되었다<sup>13</sup>. 이에 관심을 갖고 연구를 하던 중, 옷나무의 '알러지'만을 해결하면 훌륭한 암치료에 응용될 수 있다는 확신을 갖게 되어 1996년부터 연구를 시작하여 알러지 제거 방법을 개발 성공, 특수한 미세알 워터를 함유한 특수기법(특허 제 0394089호)을 이용하여 제조하였다.

우루시올(urushiol)은 피부 혹은 피질(cortex)

세포와 접촉 시 알러지 혹은 염증 반응을 일으키는 세포들을 자극하게 된다. 우루시올은 표피와 접촉 시 알러지 및 염증 반응을 일으키는 T lymphocyte 및 monocyte의 생성을 극도로 촉진시키며 이러한 세포들은 여러 종류의 cytokine, chemotactic factor 및 adhesion molecule 등의 생성을 유도하여 우루시올과의 접촉부위로 이동을 증가시킨다<sup>14)</sup>. 따라서 우루시올이 표피에 접촉되거나 혹은 체내에 주입되게 되면 생성된 cytokine, chemotactic factor 또한 adhesion molecule 등이 면역세포 및 염증세포의 수를 극대화시켜, 체내의 면역기능을 증가시키게 된다. 이러한 현상은 암환자의 경우에 있어서 면역기능의 강화를 유발시킨다는 점에서 매우 중요하다<sup>15,16)</sup>.

우루시올은 자가면역 증가의 효과 이외에 분자구조의 성격상 암세포를 직접적으로 공격하여 암세포를 제거시키는 이른바 항암제로서의 특성을 지니고 있다. Hydroquinone, 비타민 K1, K2, K3 그리고 Mitomycin C 등의 항암제는 암세포의 핵막 내로 직접 침입하여 암세포의 DNA와 결합을 하게 되며, 이러한 항암제 등에 의하여 결합된 DNA는 mitosis 기능을 잃게 되어 괴사 혹은 고사를 일으키게 된다. 언급된 항암제들이 암세포의 DNA에 결합되는 이유는 항암제들의 체내 주입 시 여러 종류의 산화 환원 효소들에 의하여 free radical을 형성하게 되며 또한 암세포의 비정상적인 활동성 및 번식력에 기인한 이상 농도의 free radical의 생성 및 이들의 항암제로의 이동반응(free radical transfer reaction)에 기인한다<sup>14,17)</sup>. 중요한 점은 우루시올은 그 구조상으로 볼때 hydroquinone의 관능기인 aromatic di-alcohol을 지니고 있으며 산화환원효소 혹은 체내의 ROS(Reactive Oxygen Species) 등에 의하여 비타민 K1의 유도체로 변환될 수 있다<sup>18,19)</sup>.

옻나무 추출수율을 비교한 실험에서 입자의 크기가 작을수록 추출수율이 올라갔으며 입자의

크기가 클 경우는 8~10시간 정도 추출 후 수율은 입자의 크기가 작은 경우와 유사한 결과를 보였다. 온도에 따른 추출정도를 비교한 결과 최적의 추출시간은 추출온도에 따라 달라지며 80~100℃의 경우 적절한 추출시간은 4시간으로 결정되었다. 또한 용매에 따른 옻나무 추출수율을 비교하기 위하여 용매를 주정으로 기본으로 하여 희석정도를 변경한 결과 추출 수율은 40%와 60% 에탄올에서 가장 높게 나왔으며 추출 시간을 고려한다면 60% 에탄올에서 가장 효율적이라고 판단 할 수 있다.

옻나무 추출물을 원추출물(A), CHCl<sub>3</sub> 분획(B), Ethylacetate 분획(C), n-butanol 분획(D), 물분획(E)으로 구분하였고 각 분획에서 얻어진 분획물의 양을 표시한 결과 아세테이트 분획의 양이 가장 많았으며 각 분획의 HPLC Chromatogram으로 분석하였는데 옻나무에 가장 많이 함유된 것은 fustin이며 그 외에 fisetin, sulfuretin, butein 등이 있었다.

최종 공정을 거쳐서 만들어진 Nexia는 표2와 같이 외형과 성분에서 quality control을 엄격히 유지하여 천연 항암제의 근거마련과 신약개발을 위한 토대를 제시하고 있으며 이를 바탕으로 임상적, 실험적인 연구가 지속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

Table 2. Certificate of Nexia Analysis

Test Items	Specifications
Shape & color	Dark brown, fine powder
Water content (% w/w)	Less than 5%
Purity (%)	Extract 100%
Microbes	<100 cfu/g
Salmonella	Negative
Coliform group	Negative
Heavy metal	<20 ppm
Fisetin(% w/w)	More than 13.0
Fustin(% w/w)	More than 7.0
Urushiol (% w/w)	N.D.
Granularity (<30 mesh)	100%

## 참고문헌

1. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 989-9992, 2002.
2. 최승훈. 동의중양학. 행림서원, 1995:1-24, 65-74.
3. 孟琳升 等. 中醫治癌大成. 北京科學技術出版社, 1995:1107.
4. 한상일, 강병기. 痞氣丸이 백혈병과 임파종 환자에서 추출한 암세포에 미치는 항암효과. 대한한방내과학회지 1991;12(2): 1-10.
5. 김강산, 강병기. 伏梁丸이 백혈병과 간암 환자에서 추출한 암세포에 미치는 항암효과. 원광한의학 1991;1(1):153-60.
6. 최호영, 김택, 유지창 등. 수종 한약제가 백혈병 세포에 미치는 영향에 대한 연구. 대한본초학회지 1999;14(1):37-44.
7. 孫燕, 余桂清. 中西醫結合防治腫瘤. 北京醫科大學中國協和大學聯合出版社. 1995:15.
8. Lee HJ, Lee EO, Rhee YH, Ahn KS, Li GX, Jiang C, Lu J, Kim SH. 이효정, 이은옥, 오세순, 안규석, 박영두, 김성훈, 가미계격당의 혈관형성 저해작용에 관한 연구, 동의생리병리학회지, 2004;18(4):1056-1060.
9. An oriental herbal cocktail, ka-mi-kae-kyuk-tang, exerts anti-cancer activities by targeting angiogenesis, apoptosis and metastasis. Carcinogenesis. 2006 Jun 15; [Epub ahead of print]
10. 송미선, 김윤상, 임은미. 건칠에 대한 문헌적 고찰. 대한한방부인과회지 2002;15(1):60-76.
11. 이승호, 조종관. 활혈화어법을 이용한 암의 전이와 성장 억제에 관한 문헌적 연구. 대전대 한의학연구소 논문집. 1998; 7(1):700.
12. Hong DH, Han SB, Lee CW et al. Cytotoxicity of urushiols isolated from sap of Korean lacquer tree (*Rhus vernicifera* Stokes). Arch Pharm Res. 1999 Dec;22(6):638-41.
13. 김명조 외 8인. 알레르기 유발성분을 배제한 옻나무 추출물(NexiaQ)의 항암 및 항산화 활성. 한의신문 1053호:12(제11차 ICOM 발표논문)
14. Schmidt RJ, Khan L, Chung LY. Are free radicals and not quinones the haptenic species derived from urushiols and other contact allergenic mono- and dihydric alkylbenzenes? The significance of NADH, glutathione, and redox cycling in the skin. Arch Dermatol Res. 1990; 282(1):56-64.
15. SH Kaufman. Apoptosis: Pharmacological Implication and Therapeutic Opportunities, Academic Press, San Diego, CA, USA. 1997.
16. Reynolds NJ, Yi JY, Fisher GJ, et al. Down-regulation of Langerhans cell protein kinase C-beta isoenzyme expression in inflammatory and hyperplastic dermatoses. Br J Dermatol. 1995 Aug;133(2):157-67.
17. R.A. Floyd. Free Radical and Cancer, Marcel Dekker, New York, USA, Chap.1, 1982.
18. Bolton JL, Pisha E, Shen L, et al. The reactivity of o-quinones which do not isomerize to quinone methides correlates with alkylcatechol-induced toxicity in human melanoma cells. Chem Biol Interact. 1997 Sep 12;106(2):133-48.
19. Wu FY, Liao WC, Chang HM.



Comparison of antitumor activity of vitamins K1, K2 and K3 on human tumor cells by two (MTT and SRB) cell

viability assays. Life Sci. 1993;52(22): 1797-804.