

HBX-6의 Sprague-Dawley rat를 이용한 단회경구투여 독성시험

진보람^{1#}, 서동욱^{1#}, 김명석², 이광호², 윤일주², 김창은^{1,3}, 안효진^{1*}

1: 상지대학교 한의과대학 약리학교실, 2 : (주)하원제약, 3: 구운식품 기업부설 연구소

Single Oral Dose Toxicity Test of HBX-6 in Sprague-Dawley Rat

Bo-Ram Jin^{1#}, Dong-Wook Seo^{1#}, Myoung-Seok Kim², Kwang-Ho Lee²,
Il-Joo Yoon², Chang Eun Kim^{1,3}, Hyo-Jin An^{1*}

1 : Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea

2 : Central Research Institute of Hawon Pharmaceutical, Jangheung 59338, Republic of Korea

3 : Guwoon Food & Research Institute, 295, Hadae-gil, Ucheon-myeon, Hoengseong-gun, Gangwon-do, Republic of Korea

#These authors contributed equally to this work.

ABSTRACT

Objectives : This study was performed to investigate the single oral toxicity of HBX-6 in Sprague-Dawley (SD) rats.

Methods : Twenty SD rats were randomly assigned to four groups of 5 rats each and were administrated singly to female and male SD rats, as an oral dose of 2000 mg/kg. HBX-6 is a newly combined Korean herbal medicine formula 30 % Ethanol extract derived from The *Dongui Bogam*. Now we are developing the prescription for the aim of improving benign prostatic hyperplasia (BPH) without undesirable side effects. HBX-6 is composed of nine medicinal herbs: Aconiti Lateralis Radix Preparata, Corni Fructus, Cistanchis Herba, Psoraleae Semen, Dendrobii Herba, Morindae Radix, Cuscutae Semen, Trigonellae Semen, Foeniculi Fructus. Animals were monitored for the mortality and changes in the body weight, clinical signs, gross observation and necropsy findings for the 14 days according to "Standard for Toxicity Study of Pharmaceuticals" of Korea Food and Drug Administration (KFDA) guideline and "Acute Oral Toxicity - Fixed Dose Procedure" of OECD Test Guideline.

Results : We could not find any mortality. Compared with the control group, significant weight change was not observed in the experimental group. After administration, the more common symptoms were not observed. There were no gross abnormalities in all cases.

Conclusions : Taken together, these results suggest that the approximate lethal dose of HBX-6 in both female and male SD rats were considered as over 2000 mg/kg.

Key words : HBX-6, single oral dose toxicity, SD rats, safety

*Corresponding author : Hyo-Jin An, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· Tel : +82 33 738 7503 · Fax : +82 33 730 0679 · E-mail : hjan@sj.ac.kr

#First author : Bo-Ram Jin, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea

· E-mail : wlsqh92@gmail.com

Dong-Wook Seo, Department of Pharmacology, College of Korean Medicine, Sangji University, 83 Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do 26339, Republic of Korea.

· E-mail : alexseo03@naver.com

· Received : 28 November 2017 · Revised : 26 December 2017 · Accepted : 15 January 2018

I. 서론

전 세계적으로 전통의학의 의료로서의 공헌이 커짐에 따라 한약의 사용량 및 사용 인구는 증가하고 있다. 이에 비해서 한약의 안전성에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 더불어 복용에 의한 간장손상 혹은 신장손상 가능성이 지속적으로 제기되고 있다. 한약이나 민간요법, 건강식품에 대한 독성과 부작용에 대한 연구가 진행되고 있으나, 보고된 대부분의 자료들은 성분이 확인되지 않은 한약이나 식품의 오·남용 등으로 발생한 임상보고가 주류를 이루고 있어 한약재 자체 혹은 한약제제의 독성에 대한 연구가 필요한 실정이다¹⁾.

근래에 들어 한약 자체의 독성 평가가 폭넓게 진행되고 있는데 단미제에 대한 독성연구로는 半夏²⁾, 杏仁³⁾, 麻黃⁴⁾ 추출물 등에서 수행되어져 왔으며, 복합 처방에 대한 연구로는 加味歸脾湯⁵⁾, 麻黃附子細辛湯⁶⁾, 補中益氣合大七氣湯⁷⁾ 등에서 수행되어져 왔다.

HBX-6는 동의보감 원방에 근거하여 한약제제 개발을 위해 구성한 조성물로서 포부자, 산수유, 육종용, 보골지, 석곡, 파극, 토사자, 호로파, 회향의 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 30% 에탄올 건조엑스이다.

HBX-6 제제의 구성약재 중 부자는 독성이 있다고 알려진 대표적인 한약재로 Sprague-Dawley (SD) 랫드에서 부자와 인삼으로 구성된 삼부탕 열수 추출물에 대해 독성연구가 수행된 바 있다⁸⁾. 그밖에 부자 외의 HBX-6 구성약재 자체 혹은 구성 한약재 추출물에 대한 단회투여독성 실험평가연구는 수행된 바 없다.

본 논문에서는 전립선 비대 랫드 모델에서 전립선 비대 억제능을 보이는 HBX-6 제제의 한약제제 개발에 대한 연구를 진행하는 중 안전성에 대한 연구로 GLP기관에서 암수 SD 랫드를 이용하여 경구 단회투여독성 실험을 실시하였으며, 장기투여 독성 실험과 생식·발생독성 실험을 위시한 특수 독성실험에 대한 기초자료를 얻고자 계획하였고, 이의 지견을 얻었기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 실험기관

GLP 기관인 대구카톨릭대학교 GLP센터에서 실험의 전 과정을 진행하였다. 본 실험은 동물보호법 (법률 제13023호, 2015. 1. 20.)을 근거한 대구가톨릭대학교 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) 심의를 통과하였다. (승인 번호 : 제 IACUC-2016-038호)

2. 실험물질

본 연구의 실험물질인 HBX-6는 하원제약 (Seoul, Korea)에서 표준화 하여 공급받았으며, 약재의 구성은 Table 1과 같다. 포부자 20 g, 산수유 120 g, 육종용 120 g, 보골지 100 g, 석곡 80 g, 파극 120 g, 토사자 120 g, 호로파 80 g, 회향 40 g을 30% 에탄올로 추출한 후 추출액을 동결 건조하여 분말

상태로 만들었다. 건조엑스 분말은 실험물질 보관실의 실온 보관고에서 밀폐하여 보관한 후, 투여 직전에 부형제에 현탁시켜 실험 물질을 제조하였다. 부형제는 실험물질의 물리적 특성실험을 수행한 결과, 물에 현탁되어 독성이 없는 멸균증류수 (중외제약)를 사용하였다.

Table 1. Herbal constituents of HBX-6

	Plant name	Amount (g)	Producing District
1	炮附子 Aconiti Lateralis Radix Preparata	20	사천
2	山茱萸 Corni Fructus	120	하남
3	肉蓯蓉 Cistanchis Herba	120	신강
4	補骨脂 Psoraleae Semen	100	하남
5	石斛 Dendrobii Herba	80	운남
6	巴戟 Morindae Radix	120	광서
7	菟絲子 Cuscutae Semen	120	내몽골
8	胡蘆巴 Trigonellae Semen	80	하남
9	茴香 Foeniculi Fructus	40	감숙

*모든 약재는 ㈜ 화평 디엔에프 (경기도, 대한민국)에서 구매하였다.

3. 실험동물

본 실험에서는 SPF (Specific Pathogen-Free) Sprague-Dawley (SD)계 랫드를 사용하였다. SD계 랫드는 의약품 등의 일반 독성 실험에 널리 사용되고 있으며, 풍부한 실험기초자료가 축적되어 있어 사람에게 대한 외삽이 가능하여 선택하였다. 입수 시에는 7주령 암컷 12마리, 172.3g~185.2g, 7주령 수컷 12마리, 200.0g~219.3g 이었으며 투여 개시 시에는 8주령 암컷 10마리, 174.4g~188.4g, 8주령 수컷 10마리, 216.5 g~245.9 g 이었다. 동물 만입 시 검역을 실시하였으며, 7일간의 순화 기간 중 매일 1회 일반 증상을 관찰하고, 투여 당일에 체중을 측정하여 동물에 이상이 없음을 확인하였다.

4. 사육환경

Polysulfone 사육상자 (260W×420L×150H mm)에 검역 및 순화, 관찰 기간 동안 3마리를 사육하였다. 사육상자에는 개체 식별카드를 부착하였고, 개체식별은 꼬리 마킹법을 사용하였다. 온도 22±3℃, 상대습도 30%~70%, 조명 시간 12시간/일 (08시 점등~20시 소등), 환기 횟수 10~20회/시간, 조도 150~300Lux의 사육환경을 유지하였다. 사육상자는 주1회, 급수병은 주 2회 교환하였으며, 모든 사육 기자재는 멸균하여 사용하였다. 물은 상수도수를 자외선 유수살균기로 여과 후 사용하였으며, 물병을 이용하여 자유롭게 섭취시켰다. 사료는 HARLAN/ENVIGO사로부터 공급받은 감마선이 조사된 실험동물용 고형사료를 자유롭게 먹도록 하였다.

5. 실험군의 구성과 투여량

실험군의 구성은 동물실 환경에서 1주간 순화시킨 실험동물을 대조군과 실험물질 HBX-6 투여군으로 나누어 각 군은 암, 수 각각 5마리로 하였다. 동의보감 유래 천연물 한약 제제인 실험물질의 정보에 따라 독성이 비교적 낮을 것이라는 예상과 실험물질 2,000 mg/kg를 암, 수 각각 한 마리에 투여한 예비 실험에서 사망한 실험체가 없는 결과를 바탕으로, 본 실험에서 실험 물질 투여군을 2,000 mg/kg으로 설정하였다. 실험물질의 투여는 투여 전날 약 15~18 시간 절식시킨 후 투여 당일 오전 10시~11시 중에 경구 투여용 존대를 장착한 주사관을 이용하여 위 내에 직접 투여하였다. 투여액량은 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 투여액량을 10 ml/kg으로 산출하여 1회/1일 투여하였다. 투여되는 조제 실험 물질은 투여 전부터 투여 종료 시간까지 지속적으로 교반하였다. 대조군은 멸균증류수만을 투여하였다.

6. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상

모든 동물에 대하여 투여 당일은 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째 관찰하였으며, 익일부터 부검일까지 1일 1회 일반증상을 관찰하였다.

2) 체중측정

모든 동물의 체중을 입수일, 군 분리일 및 투여일에 측정하고, 이후에는 투여 후 1, 3, 7 및 14일 (부검일)에 측정하였다.

3) 부검소견

실험물질 투여 후 14일째 되는 날 전체 동물에 대해 체중을 측정하고 Isoflurane 마취하에 개복하여 복대동맥 및 정맥을 절단하여 방혈치사 시킨 후 부검을 실시하였다. 육안으로 모든 내부 장기의 이상 유무를 관찰하여 그 소견을 기록하였다.

7. 통계 처리

통계학적 분석은 널리 사용되고 있는 통계 패키지인 SPSS 19.0k를 이용하여 일원배치분산분석 (ANOVA test)을 통해 실험군의 독성지표를 대조군과 비교하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 사망동물 및 최소치사량

전 실험기간 동안 대조군을 포함한 HBX-6 투여 실험군에서 사망동물은 관찰되지 않았다 (Table 2). 따라서 본 실험에서 개략치사량은 2,000 mg/kg 이상으로 사료된다.

Table 2. Mortalities Observed in Female and Male Rats after Single Oral Treatment of HBX-6

Sex	Dose (mg/kg)	No. dead/No. dosed	Days after dosing										
			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9~14	
Female	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Male	0	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2,000	0/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ALD value : > 2,000 mg/kg

2. 일반 증상

투여날부터 부검일까지 모든 동물에서 이상 증상은 관찰되지 않았다 (Table 3).

Table 3. Clinical Signs Observed in Female and Male Rats after Single Oral Treatment of HBX-6

Day	Sign observed	Groups(mg/kg)				Day	Sign observed	Groups(mg/kg)			
		Female		Male				Female		Male	
		G1(0)	G2(2000)	G1(0)	G2(3000)			G1(0)	G2(2000)	G1(0)	G2(3000)
0	Normal	5/5*	5/5	5/5*	5/5	8	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
1	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	9	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
2	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	10	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
3	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	11	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
4	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	12	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
5	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	13	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
6	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5	14	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5
7	Normal	5/5	5/5	5/5	5/5						

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined.

Clinical Signs was observed once per every day between day 1 and day 14. On day of administration, Clinical signs were observed for 30 minutes, 1, 2, 4 and 6 hours after dosing.

3. 체중

체중변화 (body weight changes) 및 증체량 (weight gains) 측정 결과, 암컷 대조군과 실험물질 투여군은 각각 107.0 ± 13.60 g 및 104.5 ± 14.93 g 으로 균간 증체량에 있어서 통

계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 수컷 대조군과 실험물질 투여군은 각각 107.0 ± 13.60 g 과 104.5 ± 14.93 g 증체량을 보였으며, 대조군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$), (Fig 1,2, Table 4).

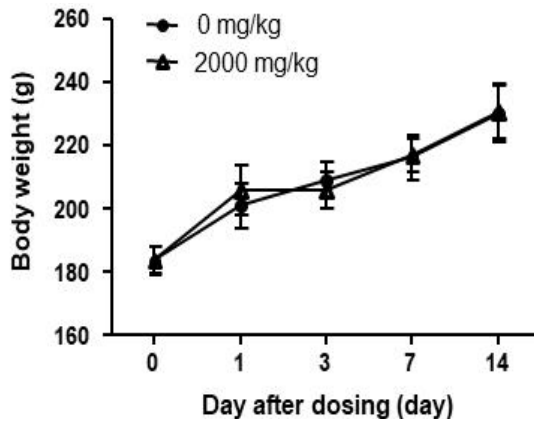


Figure 1. Body weight of single oral dose toxicity study in female SD rats.

Changes on the body weights during 14 days of observation in female rats after single oral treatment of HBX-6. No significant changes on body weights were detected in all HBX-6 treated rats as compared with vehicle control rats, respectively. Values are expressed as mean ± SD of five female mice. 0 mg/kg = single oral treatment of HBX-6 0 mg/kg, 2,000 mg/kg = single oral treatment of HBX-6 2,000 mg/kg.

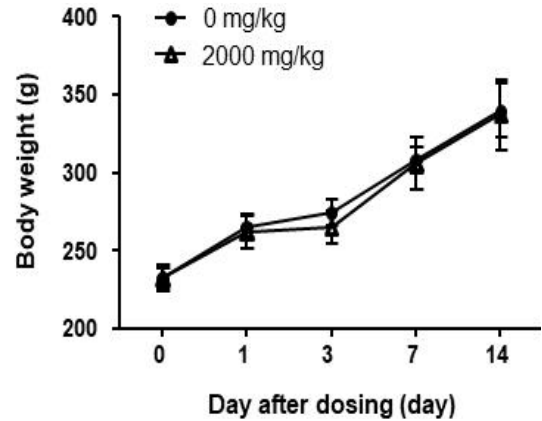


Figure 2. Body weight of single oral dose toxicity study in male SD rats.

Changes on the body weights during 14 days of observation in male rats after single oral treatment of HBX-6. No significant changes on body weights were detected in all HBX-6 treated rats as compared with vehicle control rats, respectively. Values are expressed as mean ± S.D. of five male mice. 0 mg/kg = single oral treatment of HBX-6 0 mg/kg, 2,000 mg/kg = single oral treatment of HBX-6 2,000 mg/kg.

Table 4. Body Weight of Single Oral Dose Toxicity Study in SD Rats

Sex		Day after dosing					Gain* 0~14	
		0	1	3	7	14		
Female	G1 0	Mean	183.7	201.0	209.1	216.3	230.3	107.0
		S.D.	4.33	7.05	5.68	7.09	9.12	13.60
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	Mean	183.7	205.8	205.9	216.8	230.7	104.5
		S.D.	4.18	7.99	5.71	5.33	8.52	14.93
		N	5	5	5	5	5	5
Male	G1 0	Mean	232.7	265.4	274.4	308.4	339.8	107.0
		S.D.	6.18	6.91	8.50	8.41	17.47	13.60
		N	5	5	5	5	5	5
	G2 2,000	Mean	232.6	262.0	264.9	305.8	337.2	104.5
		S.D.	8.47	11.13	10.28	16.74	22.60	14.93
		N	5	5	5	5	5	5

*: Weight gains are body weight difference between day 14 and day 0.

Body weight of all animals was measured on the date of entry, division into each group and administration, and was measured in 1, 3, 7 and 14 days after administration.

4. 육안적 부검소견

관찰 기간 동안 생존한 동물에 대한 계획 부검 시 이상소견은 관찰되지 않았다 (Table 5).

Table 5. Necropsy Findings Observed Female and Male Rats after Single Oral Treatment of HBX-6

Sex	Groups (mg/kg)	Observed signs	Frequency	
			Death	Survivors
Female	G1(0)	No gross findings	0/0	5/5*
	G2(2,000)	No gross findings	0/0	5/5
Male	G1(0)	No gross findings	0/0	5/5*
	G2(2,000)	No gross findings	0/0	5/5

*; Number of animals with the sign/Number of animals examined. On the 14 day after administration, the body weight of all animal was measured. After the anesthesia, the abdomen was cut off and necropsy was conducted. All internal organs were visually observed and then the medical opinions were recorded.

IV. 고 찰

최근 들어 평균 수명이 증가하고 노인 인구가 늘어남에 따라 전립선비대증에 대한 관심이 급증하고, 임상적 비중 또한 높아지고 있음에도 현재까지 전립선비대증의 병인에 관한 기전 및 그 치료방법이 확실하게 정립되어 있지 않다. 전립선비대증의 양방 약물학적 치료로는 알파차단제, 5-알파 환원효소 억제제, 항 콜린제의 사용, 생약 및 보완대체요법을 들 수 있다. 그러나 알파차단제와 5-알파 환원효소 억제제의 복용에 대한 부작용으로 사정 장애, 콜라겐의 과생성에 의한 섬유화증, 성욕 감퇴 등이 보고된 바 있다⁹⁾. 이 외에도 생약 및 보완대체요법은 아직까지 장기간의 임상 결과가 축적되어 있지 않은 상태로, 전립선비대증에 효과가 있다고 알려진 생약제제로 톱야자 추출물(Saw Palmetto), 아프리카 서양자두나무(African Plum), 하이포시스루페리(Hypoxis Rooperi), 호밀(Secale Cereale), 콜레스테롤을 저하시키는 콩류, 아연 등이 있다¹⁰⁾.

근래 들어 보완대체의학에 대한 사회적 관심이 높아지는 한편, 한약재의 안전성에 대해 끊임없이 문제가 제기되고 있는 만큼 한약재 자체 혹은 한약제제 복용의 독성평가가 필요한 실정이다. 한약 자체의 독성에 의한 간장손상이나 신장손상 등의 임상사례가 보고된바 있으나 진품 약재가 아닌 대체약물의 부적절한 사용, 잔류농약과 중금속 등 약재의 오염과 관련된 문제와 함께 한약재의 과도한 사용량에 의한 독성도 적지 않다¹¹⁾.

HBX-6는 동의보감 원방에 근거하여 한약제제 개발을 위해 구성한 조성물로서 포부자, 산수유, 육종용, 보골지, 석곡, 파극, 토사자, 호로파, 회향의 혼합생약 추출물을 유효성분으로 함유하는 황갈색의 30% 에탄올 건조엑스이다.

현재까지 HBX-6의 약효에 관하여, 테스토스테론으로 유도된 전립선 비대 랫드 모델에서 HBX-6의 투여에 의해 랫드의 체중 대비 전립선 중량이 억제되는 것을 확인하였고, 혈청 내 테스토스테론과 디하이드로테스토스테론의 수치가 증가하는 것을 HBX-6가 억제하는 것을 확인하였다. 또한 테스토스테론으로 유도한 랫드에서 HBX-6의 투여가 전립선 비대로 변하는 전형적인 조직변화 형태를 억제함을 확인하였고, 일반적으로 전립선 비대증의 치료제로 가장 많이 사용되는 피나스테라이드의 투여군보다 유의한 수준으로 효능을 보임을 확인하였다.

본 연구에서는 HBX-6의 일반 독성시험 중 현재 한국 식품

의약품 안전처 고시 “의약품 등의 독성시험기준”¹²⁾에 명시되어 있는 랫드 경구 단회투여독성 실험을 실시하여, 장기투여 독성 시험과 생식·발생독성 시험을 위시한 특수 독성시험에 대한 기초자료 제공 및 HBX-6에 대한 유효성 평가, 임상적 유효용량 설정 및 적정 투여용량, 최대 용량 설정을 위한 연구에 근거를 제공하고자 하였다. 한국식품의약품 안전처 고시¹²⁾ 및 OECD 기준¹³⁾에 따르면, 랫드에서 투여 한계 농도를 2000 mg/kg 또는 최대 용해농도로 규정하고 있고, 투여용량은 10 ml/kg을 넘지 않을 것을 권장하고 있다. 본 실험에서 사용한 HBX-6는 동의보감 유래 천연물 한약 제제로써 독성이 비교적 낮을 것으로 예상되었으며, 예비적으로 암, 수컷 각각 한 마리에 2,000 mg/kg를 투여한 후 모두 생존하며, 멸균 증류수에 200 mg/ml 까지 비교적 잘 현탁되어, 10 ml/kg의 용량 즉, 2000 mg/kg을 최고 농도로 설정하였다. 이후 사람에 대한 임상 예정 경로로서 경구 투여를 선택하여 랫드를 대상으로 각 군당 10마리 (암, 수컷 5마리) 에 단회 경구 투여하고, 14일간 체중 및 임상증상을 관찰하였으며, 실험 물질 투여 14일 후 최종 부검을 통하여 내부 장기에 대한 이상 유무 검사를 실시하여 독성지표를 관찰하였다. 그 결과, 단회투여 독성 실험에서 설치류 최대 한계투여 용량인 2,000 mg/kg까지 HBX-6 투여와 관련된 사망 동물, 일반증상 및 부검소견에서 이상소견은 관찰되지 않았다. 관찰기간 동안 체중변화 및 증체량을 관찰한 결과, 암컷 대조군과 실험물질 투여군은 각각 107.0±13.60 g 및 104.5±14.93 g 증체량을 보였으며, 부형제 대조군 (0 mg/kg)에 비해 통계적으로 유의한 차이가 없었다 ($p > 0.05$). 그리고 수컷 대조군과 실험물질 투여군은 각각 107.0±13.60 g 과 104.5 ± 14.93 g 으로 군간 증체량에 있어서 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p > 0.05$).

US Environmental Protection Agency의 Acute Toxicity Test Guidelines¹⁴⁾에 따르면 일반적으로 반수 치사량이 5,000~15,000 mg/kg인 물질을 무독성 물질로, 500~5,000 mg/kg을 비교적 저독성 (Class III) 물질로 규정하고 있으나, 한국식품의약품 안전처 고시 제 2014-136호¹²⁾ 및 OECD¹³⁾ 기준에 따르면, 설치류에서 투여한계 농도를 2,000 mg/kg으로 제한하고 있다. 이상의 결과를 볼 때, 본 실험의 SD 랫드 단회 경구투여 독성실험에서 HBX-6의 개략적 치사량 (ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 나타나 비교적 안전한 약물로 추정된다.

V. 결 론

HBX-6의 Sprague-Dawley 랫드 단회 경구 투여 독성 평가 실험을 수행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 전립선 비대증 치료 천연물 한약 제제 개발을 위한 HBX-6에 대한 암수 랫드를 이용한 단회경구투여 독성 실험을 실시한 결과, 2,000 mg/kg까지 투여와 관련된 사망례는 관찰되지 않았다.
2. HBX-6 투여와 관련된 임상증상, 체중변화는 관찰되지 않았다.

3. 주요 장기에 대한 검사에서도 HBX-6 투여와 관련된 이상변화는 관찰되지 않았다.

이상으로 본 실험결과를 통해, HBX-6의 개략적 치사량 (ALD)은 한계량인 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 관찰되어, 비교적 안전한 약물로 판단된다.

Acknowledgement

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number : HI16C0477)

References

1. Park H,m., Jang I.S., Lee S.D. Hepatotoxic Events Associated with Herbal Medicinal Products, Folk Remedies and Food Supplements in Korea, *J Korean Oriental Med* 2005;26(2):152-165.
2. Lee J.E., Kim H.J., Choi E.K., Chai H.Y., Yun Y.W., Kim D.J. Four-week repeated-dose toxicity study on Pinellia Extract. *The Korean journal of laboratory animal science*. 2003;19:127-41.
3. Kim S.R., Lee J.W., Lim S.Y., Jung Y.S., Choi H.Y., Kim J.D. Rat Single Oral Dose Toxicity Test of *Armeniacae Semen*, *Korean J. Orient. Int. Med.* 2012; 33(2)145-159.
4. Theoharides T.C. Sudden death of a healthy college student related to ephedrine toxicity from a mahuang-containing drink, *JCI in Psychopharmacol.* 1997;17:437-9.
5. Hwang S.Y., Kwon W., Chai H.Y., Cho Y.M., Ryu J.M., Kim D.K., Sin J.S., Kim T.K., Cho J.H., Shin S.H., Park J.H., Kang J.K., Kim Y.B. Four-Week Repeated-Dose Toxicity Study on Kamiguibitang. *The Korean journal of laboratory animal science*. 2004;20(3):267-73.
6. Sung I.J., Park M.Y., Cheon W.H., Kim J.D. Mouse Single Oral Dose Toxicity Test and Bone Marrow Micronucleus Test of Mahwangbujaseshin-tang Extracts, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*. 2010;24(1):124-133.
7. Bae Y.C., Choi B.H., Kim D.W., Hur J.I., Byun J.S., Kim D.J. Single Dose Toxicity Test of Bojungikkeehapdaechilkitang water extract in Male and Female ICR Mice. *Korean J. Orient. Int. Med.* 2005;26(2):369-378.
8. Jeong H.R., Son B.W., Kim G.C., Shin S.S., Hwang W.D. Single Oral Dose Toxicity Study and Aconitine Content Analysis of Raw Aconiti Tuber and Sambutang. *J. Int. Korean Med.* 2016;37(3)427-441.
9. Lepor, H., Kazzazi, A., Djavan, B. alpha-Blockers for benign prostatic hyperplasia: the new era. *Curr Opin Urol.* 2012;Jan;22(1):7-15.
10. Fagelman E, Lowe F.C. Herbal medications in the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH). *Urol Clin North Am.* 2002;Feb;29(1):23-9.
11. Jang I.S., Yang C.S., Lee S.D., Han C.H. A Review of Herbal Medicinal Products Associated with Toxic Events in Korea, *J Korean Oriental Med.* 2007;28 (1)1-10
12. Ministry of food and drug safety, Standard for Toxicity study of Pharmaceuticals, Korea National Institute of Health Notification No. 2014-136, 2014.
13. Organization for Economic Co-Operation and Development(Ed.). OECD guideline (423) for testing of chemicals - acute oral toxicity-acute toxic class method. 2001.
14. US Environmental Protection Agency. Health Effects Test Guidelines OPPTS 870.100, Acute Toxicity Testing Background, US EPA December-Washington, USA, 2002.