



## 초오약침의 단회 및 4주 반복 투여 독성에 관한 실험적 연구

이현수 · 이윤규 · 이봉효 · 김재수 · 임성철 · 이현종

대구한의대학교 한의과대학 침구경혈학교실

### An Experimental Study on Single-dose and 4 Weeks Repeated-dose Toxicity of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Hyun Su Lee, Yun Kyu Lee, Bong Hyo Lee, Jae Soo Kim, Sung Chul Lim, Hyun-Jong Lee

Department of Acupuncture, Moxibustion and Acupoint, College of Korean Medicine, Daegu Haany University

**Objectives :** This study was performed to examine the toxicity of *Aconitum ciliare Decaisne* pharmacopuncture(ADP). **Methods :** The toxicity was evaluated for lethal dose for 50 percent kill(LD50), single dose and repeated dose for 4 weeks. Toxic symptoms, weight measurement, hematological test, blood biochemical test, visual examination and weight measurement of major organs and histopathological test were observed for 4 weeks. Dose of 300, 600, 1,200, 2,400, 3,600, 4,800, 6,000, 7,200 mg/kg in the LD50 experiment, 300, 600, 1,200 mg/kg/day in the single experiment, 150, 300, 600 mg/kg/day in 4 weeks experiments were injected into BALB/c mice. The ADP was injected into ST36 of the right leg. Normal saline solution of same volume was used for control group. In 24 hours after the last treatment, blood samples were taken after anesthesia by inhalation of ethyl ether. After that, the BALB/c mice were euthanized. Their heart, lungs, kidneys, liver and reproductive organs were removed and weighed. Histopathological evaluation was also performed. **Results :** ADP's LD50 was measured at 6,000 mg/kg. In both single and repeated dose toxicity test, no BALB/c mouse died during the experiments. ADP treatment for 4 weeks did not show any significant changes in toxic symptoms, weight measurement, hematological test, blood biochemical test, visual examination and weight measurement of major organs and histopathological test. **Conclusions :** As a result, ADP's LD50 was 6,000 mg/kg and repeated dose at a concentration of 600 mg/kg or less is considered to be not harmful for clinical treatment.

**Key words :** *Aconitum ciliare Decaisne*, pharmacopuncture, toxicity

## 서론

최근 현대 사회의 급속한 발전 및 의학기술의 발달로 인해 평균 수명이 늘어나면서 신체 수명은 늘어났지만 그에 따른 각종 성인병이나 퇴행성, 난치성 질환 등이 증가하고 있는 실정이다. 한의학에서는 “以毒治病”으로 퇴행성, 난치성 질환 등을 치료를 하는 경우

가 있다<sup>1)</sup>. 대표적인 한약재들로는 초오, 천오, 부자, 섬수, 오공, 사독 등이 있으며 봉약침도 이에 해당된다.

초오는 미나리아재비과(毛根科: Ranunculaceae)에 속한 多年生 本草인 늦짓가락나물 *Aconitum ciliare Decaisne*와 同屬近緣植物의 塊根을 건조한 것이다<sup>2)</sup>. 초오의 歸經은 心, 肝, 腎, 脾經이고 性味는 辛, 甘, 苦하고 溫熱하며 大毒하다<sup>3,4)</sup>. 초오의 효능은 祛風除

Received November 29, 2017, Revised December 11, 2017, Accepted December 15, 2017

Corresponding author: Hyun-Jong Lee

Department of Acupuncture, Moxibustion and Acupoint, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 136 Sincheondong-ro, Suseong-gu, Daegu 42158, Korea

Tel: +82-53-770-2115, Fax: +82-53-764-0566, E-mail: whiteyou@hanmail.net

© This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

濕, 溫經止痛, 癱瘓止痛, 開豁痰하여 風寒濕痺, 關節疼痛, 心腹冷痛, 寒疝作痛, 坐骨神經痛, 中風半身不隨, 手足拘攣, 陰疽 등을 치료 한다<sup>4,6)</sup>. <東醫寶鑑>에서는 “治風濕癱痺疼痛, 發破傷風汗”이라고 하였다<sup>5)</sup>.

초오의 성분은 aconitine, hypaconitine, mesaconitine, deoxyaconitine 등이 함유되어 있다<sup>2,5)</sup>. 이 중의 주요 성분인 aconitine은 독성이 가장 커서 0.2 mg을 복용하면 바로 중독될 수 있고 3~4 mg을 복용하면 죽음에 이를 수가 있다<sup>7)</sup>. 실제 aconitine 중독에 대해서 임 등<sup>8)</sup>은 일시적인 사지마비와 저칼륨혈증을 보고 하였으며, 최 등<sup>9)</sup>은 저혈압 소견과 빈맥, 오심이나 구토, 손발 저림을 보고하였으며, 김<sup>10)</sup>은 심실부정맥을 보고하였다. 초오는 임상적으로 많이 사용되고 있지만, 아직까지 초오 독성에 대한 계속적인 연구와 노력이 필요한 실정이며 실제 부작용으로 인해 환자 치료에 이용하기가 아주 조심스럽다. 이에 초오의 임상 활용 방법 중 하나인 초오약침을 부작용 없이 사용하기 위해 독성연구를 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험 방법

### 1. 초오약침의 조제

잘 건조된 초오(신홍제약, 한국) 100 g을 추출 반응조에 넣고 3차 증류수를 1,000 ml 가한 후 100°C에서 6시간 동안 추출하였다. 추출액을 5 μm 와트만 여과지로 1차 여과한 후 60°C에서 감압 농축을 시행하여 건조 추출물 8.21 g을 얻었다. 이를 다시 증류수 200 ml에 녹여 0.2 μm 여과지로 2차 여과를 시행한 후 동결 건조하여 최종 6.00 g의 추출물을 얻었다. 얻어진 추출물을 clean bench에서 대한약침제형연구회의 Osmonics E4 water purification machine(General electric, Minnetonka, MN, USA)을 이용하여 제조한 주사용수(Water for injection)에 적정비율로 희석하고 pH와 염도를 보정한 후 clean room에서 실험에 사용할 초오약침을 충전하여 조제하였다.

### 2. 실험동물

본 연구에서는 (주)샘타코(경기도, 대한민국)에서 구입한 약 30 g 전후의 수컷과 암컷 BALB/c mouse(10주령 약 30 g)을 사용하였다. BALB/c mouse는 온도 23~24°C, 습도 40~60%, 조명 12시간 명/암이 자동적으로 유지되는 사육실에서 무균 음수와 사료를 자유롭게 공급하여 사육하고 실험실 환경에 1주 이상 적응시킨 후 사용하였다.

반수치사량(Lethal dose for 50 percent kill, LD50) 측정실험을 진행한 후 그 결과를 바탕으로 단회 및 4주 반복독성 실험을 진행하였는데, 각 독성 실험에서 실험군을 저농도군, 중농도군, 고농도군으로 나누고 대조군과 비교하였다.

본 연구의 모든 과정은 동의대학교 동물실험윤리위원회의 규정 및 방침에 따라 진행되었다(승인번호: R2016-031).

### 3. 반수치사량 측정실험

LD50 측정실험에서는 BALB/c mouse를 암, 수 각각 8마리로 총 16마리를 준비하였다. 한 군을 2마리씩(각각 암/수 1마리)로 하여 300, 600, 1,200, 2,400, 3,600, 4,800, 6,000, 7,200 mg/kg의 농도로 오른쪽 다리 ST36(Zusanli)혈 부근에 0.2 ml씩 주입하여 실험 BALB/c mouse의 사망 여부를 관찰하였다. 골도분촌법에 준하여 인체의 ST36(Zusanli)혈에 상응하는 부위를 실험 BALB/c mouse의 우측 후지에 취하였다.

시술당일(0일)에는 시술 후 30분까지는 빈번하게, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 시술 후 1일부터 1주일까지는 매일 1회 쥐의 사망유무를 관찰하였다.

### 4. 단회 독성 실험

단회 독성은 평균체중에 가까운 BALB/c mouse를 암·수 각 20마리를 선발하였다. 선발한 BALB/c mouse를 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암·수 각 4군, 군당 5마리로 군을 분리하였다.

LD50 실험에서의 결과를 바탕으로 단회 독성 실험의 투여량은 각각 저농도군(Group II)에서는 300 mg/kg/day, 중농도군(Group III)에는 600 mg/kg/day, 고농도군(Group IV)은 1,200 mg/kg/day를 우측 ST36(Zusanli)혈 부근에 0.2 ml씩을 투여하였다. 대조군(Group I)에는 초오약침과 동일한 양의 생리식염수를 투여하였다.

시술당일(0일)에는 시술 후 30분까지는 빈번하게, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 시술 후 1일부터 2주까지는 매일 1회 일반 증상을 관찰하였다.

### 5. 4주 반복 독성 실험

4주 반복 독성은 평균체중에 가까운 BALB/c mouse 암·수 각 20마리를 선발하였다. 선발한 BALB/c mouse를 각 군 평균체중이 균등하도록 무작위로 암·수 각 4군, 군당 5마리로 군을 분리하였다.

LD50 실험에서의 결과를 바탕으로 실험군(Group VI, VII, VIII)의 1회 투여량은 각각 저 농도군(Group VI)에서는 150 mg/kg/day,

중농도군(Group VII)에는 300 mg/kg/day, 고농도군(Group VIII)은 600 mg/kg/day를 우측 ST36(Zusanli)혈 부근에 0.2 ml씩을 투여하였다. 대조군(Group V)에는 초오약침과 같이 우측 ST36(Zusanli)혈 부근에 0.2 ml씩의 생리식염수를 시술하였다.

1) **일반증상 관찰:** 시술당일(0일)에는 시술 후 30분까지는 빈번하게, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태(독성징후의 종류, 발현시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 이후 4주 반복 실험에서 시술 후 1일부터 각각의 실험 종료일까지 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

2) **체중측정:** 시술당일(시술 전), 시술 후 1주 및 2주, 3주, 그리고 4주(부검일)에 측정하였다.

3) **혈액학적 검사:** 부검 전 12시간 절식시킨 BALB/c mouse를 에틸에테르로 마취시킨 후 혈액을 채취하고 안락사시켰다. 채혈하여 얻은 혈액의 일부를 EDTA로 항응고 처리하여 혈구자동측정기(Hemavet, Drew Scientific Co, Oxford, CT, USA)로 White blood cell(WBC), Red blood cell(RBC), Hemoglobin, Hematocrit(HCT), Platelet, Mean cell volume(MCV), Mean cell hemoglobin(MCH), Mean cell hemoglobin concentration(MCHC)를 측정하였다.

4) **혈액생화학적 검사:** 채혈한 전혈 일부를 15분간 원심분리(3,000 rpm, Eppendorf, Hamburg, Germany) 한 후 혈청을 취하여 혈청자동분석기(Hitachi7060, Hitachi, Tokyo, Japan)를 이용하여 Total protein, Albumin, Total bilirubin, Alkaline phosphatase(ALP), Aspartate aminotransferase(AST), Alanine aminotransferase(ALT), Creatinine, Blood urea nitrogen(BUN), Total cholesterol, Triglycerides, Glucose를 측정하였다.

5) **주요 장기의 육안 검사 및 중량 측정:** 4주 반복 독성 실험 관찰기간 종료 후 채혈 후 부검하였다.

부검을 실시하는 대조군 및 실험군의 모든 BALB/c mouse에 대하여 심장(Heart), 간(Liver), 신장(Kidney), 뇌(Brain), 폐(Lung), 비장(Spleen), 흉선(Thymus), 정소(Testis) 또는 난소(Ovary), 비복근(Gastrocnemius) 등의 장기를 적출하고, 육안조직검사 지침에 따라 각 장기 조직의 부위별로 병변을 조사하고, 조직의 크기, 중량(g), 색, 모양, 경도 그리고 병변 부위의 크기, 모양, 색, 특징 등을

**Table 1.** LD50 Test of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Dose (mg/kg)	300	600	1,200	2,400	3,600	4,800	6,000	7,200
Mortality %	2/2 100	2/2 100	2/2 100	2/2 100	2/2 100	2/2 100	1/2 50	0/2 0

검사하였다.

6) **조직병리학적 검사:** 고정된 간조직과 신장조직은 삭정, 탈수 및 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거쳐 조직절편을 제작하여 박절한 후 Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색을 실시하였다. H&E staining은 동물조직학에서 일반적으로 사용하는 염색법으로 H&E staining은 검푸른 색을 내는 Hematoxylin과 붉은 색을 내는 Eosin의 두 염료를 이용하여 세포의 핵과 세포질을 관찰할 수 있다. 세포핵은 검푸르게 염색되며 대부분의 세포질 성분은 분홍색 또는 붉은색으로 염색된다.

## 6. 통계처리

실험에서 얻어진 결과들은 SPSS(version 22, Chicago, IL, USA)와 SAS(version 9.1.3, SAS Institute Inc., U.S.A.)를 사용하여 Kolmogorov-Smirnov test와 Shapiro-Wilk test 방법으로 정규성 검정을 시행하였으며, Bartlett test를 실시하여 등분산성을 검정하였다. 등분산의 경우 One-way analysis of variance(ANOVA)를 실시하였으며, 또한 각 항목별로 일대일 Student T-test를 시행하여 유의성을 검정하였다. 모든 측정값은 평균±표준편차(mean±S.D.)로 표기하였다.

## 결 과

### 1. LD50 측정실험

초오약침을 300, 600, 1,200, 2,400, 3,600, 4,800 mg/kg을 우측 ST36(Zusanli)혈 부근에 0.2 ml씩을 투여한 경우에 100% 생존하였으나 6,000 mg/kg을 투여의 경우 50% 생존, 7,200 mg/kg에는 모두 사망하였다(Table 1). 따라서 초오약침의 LD50은 6,000

**Table 2.** Mortality of BALB/c Mouse in Single Toxicity Test of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Sex	Group	Number of animal	Number of death	Mortality (%)
Male	I	5	0	0
	II	5	0	0
	III	5	0	0
	IV	5	0	0
Female	I	5	0	0
	II	5	0	0
	III	5	0	0
	IV	5	0	0

Group I : Control group, Group II : Low dose group(300 mg/kg/day), Group III : Medium dose group(600 mg/kg/day), Group IV : High dose group(1,200 mg/kg/day).

mg/kg로 측정되었다.

## 2. 단회 독성 실험

초오약침을 1회 시술 후 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태를 관찰한 결과, 모든 실험군에서 어떠한 독성 징후도 발견되지 않았다. 시술 후 2주까지는 사망한 BALB/c mouse는 없었다(Table 2).

## 3. 4주 반복 독성 실험

1) **사망률:** 초오약침을 투여한 후 4주간 사망유무를 관찰한 결과, 모든 실험군(Group VI, VII, VIII)에서 초오 약침의 투여에 의해 기인된 사망은 관찰되지 않았다(Table 3).

2) **일반증상:** 4주의 실험기간 중 독성물질로 발생할 수 있는 털 빠짐(loss of fur), 설사(diarrhea), 다뇨(polyuria), 연변(soft stool), 운동성감소(decreased motor activity), 떨림(tremor), 부종(edema) 등의 증상발현 유무를 관찰한 결과, 암·수 모든 실험군

**Table 3.** Mortality of BALB/c Mouse Treated with *Aconitum ciliale* Decaisne Pharmacopuncture for 4 Weeks

Sex	Group	Number of animal	Number of death	Mortality (%)
Male	V	5	0	0
	VI	5	0	0
	VII	5	0	0
	VIII	5	0	0
Female	V	5	0	0
	VI	5	0	0
	VII	5	0	0
	VIII	5	0	0

Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day) Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).

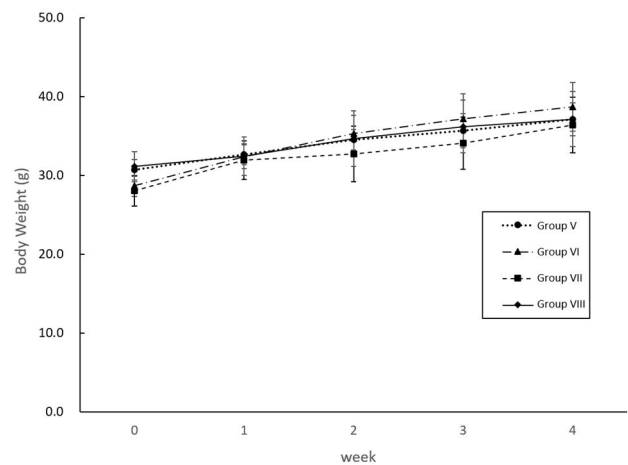
**Table 4.** Clinical Findings of BALB/c Mouse Treated with *Aconitum ciliale* Decaisne Pharmacopuncture for 4 Weeks

Signs	Male				Female			
	V	VI	VII	VIII	V	VI	VII	VIII
Loss of fur	0	0	0	0	0	0	0	0
Diarrhea	0	0	0	0	0	0	0	0
Polyuria	0	0	0	0	0	0	0	0
Soft stool	0	0	0	0	0	0	0	0
Decreased motor activity	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremor	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0

Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day) Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).

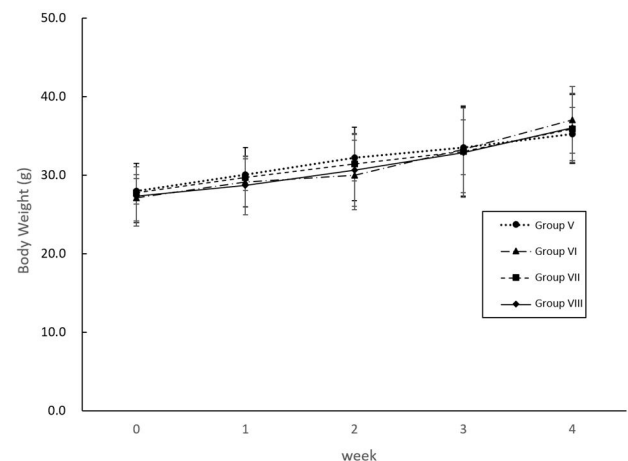
(Group VI, VII, VIII)에서 초오약침 투여로 인한 독성 증상은 관찰되지 않았다(Table 4).

3) **체중변화:** 실험 개시 때의 BALB/c mouse의 체중은 수컷의 경우 대조군(Group V)은  $30.7 \pm 1.3$  g이었고 저농도군(Group VI)은  $28.7 \pm 1.3$  g, 중농도군(Group VII)은  $28.0 \pm 2.0$  g, 고농도군(Group VIII)은  $31.1 \pm 1.9$  g이었으며, 4주 후 실험 종료 시에는 대조군(Group V)은  $37.1 \pm 2.1$  g이었고 저농도군(Group VI)은



**Fig. 1.** Body Weight Changes of Male BALB/c Mouse in the 4 Weeks Toxicity Study.

Data represent the mean  $\pm$  S.D. Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).



**Fig. 2.** Body Weight Changes of Female BALB/c Mouse in the 4 Weeks Toxicity Study.

Data represent the mean  $\pm$  S.D. Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).

38.7±3.1 g, 중농도군(Group VII)은 36.4±1.9 g, 고농도군(Group VIII)은 37.2±3.5 g이었다(Fig. 1). 체중 증가율을 살펴보면 대조군(Group V)은 23.9±2.1%이었고 저농도군(Group VI)은 29.8±7.8%, 중농도군(Group VII)은 27.8±3.6%, 고농도군(Group VIII)은 24.7±3.6%로 각 그룹별 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 1).

암컷의 경우 대조군(Group V)은 28.0±1.6 g이었고 저농도군(Group VI)은 27.1±3.0 g, 중농도군(Group VII)은 27.8±3.0 g, 고농도군(Group VIII)은 27.3±3.8 g이었으며, 4주 후 실험 종료 시에는 대조군(Group V)은 35.3±3.4 g이었고 저농도군(Group VI)은 37.1±4.3 g, 중농도군(Group VII)은 35.9±4.3 g, 고농도군(Group VIII)은 36.1±4.4 g이었다(Fig. 2). 체중 증가율을 살펴보면 대조군(Group V)은 24.2±5.4%이었고 저농도군(Group VI)은 26.9±5.5%, 중농도군(Group VII)은 26.5±5.9%, 고농도군(Group VIII)은 28.1±2.9%로 각 그룹별 유의성 있는 차이는 없었다(Fig. 2).

결과적으로 4주간의 실험군(Group VI, VII, VIII)의 체중을 측정 한 결과, 암·수 BALB/c mouse 모두 초오 약침 투여에 의한 체중 변화는 모든 농도에서 대조군(Group V)과 비교하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다.

**4) 주요 장기의 중량변화:** 초오약침을 시술 4주 후에 각 실험군

(Group VI, VII, VIII)의 장기를 적출하여 육안적 소견을 관찰하고 중량을 측정하였다. 그 결과, 3종류 농도의 초오약침 투여군의 모든 장기에서 육안적 소견상 특이할 만한 병적소견은 발견되지 않았다. 적출된 장기들 중에서 간의 무게는 대조군(Group V)에 비해 초오 약침의 농도가 증가됨에 따라 수컷에서 다소 증가되는 경향이 있었으나 유의성 있는 차이는 없었으며 다른 장기들에서는 초오약침 시술에 따른 특이적인 변화는 관찰되지 않았다(Table 5).

**5) 혈액학적 검사:** 4주간의 반복 투여 독성 실험에서 28일간 초오약침을 투여한 후 실험군(Group VI, VII, VIII)을 에틸에테르로 마취하고 복부대동맥으로부터 채혈하여 혈액학적 지표인 WBC, RBC, Hemoglobin, HCT, Platelet, MCV, MCH, MCHC를 혈구자동측정기로 측정하였다.

그 결과, 혈액학적 지표들은 초오약침을 투여한 실험군(Group VI, VII, VIII)에서 대조군(Group V)과의 통계적으로 유의성 있는 차이를 보이지 않았다(Table 6).

**6) 혈액생화학적 검사:** 4주간 초오약침을 투여한 후 실험군(Group VI, VII, VIII)로부터 혈액을 채취하여 Total protein, Albumin, Total bilirubin, ALP, AST, ALT, Creatinine, BUN, Total cholesterol, Triglyceride, Glucose의 수치를 측정하였다.

위의 혈액생화학적 지표들의 검사에서 대조군(Group V)과 실험

**Table 5.** Organ Weight Values of Male and Female BALB/c Mouse in the 4 Week Toxicity Study of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Sex	Organ	Group V	Group VI	Group VII	Group VIII
Male	Heart(g)	0.13±0.03	0.14±0.02	0.14±0.04	0.13±0.04
	Liver(g)	1.30±0.25	1.35±0.11	1.45±0.16	1.55±0.19
	Right kidney(g)	0.23±0.05	0.27±0.07	0.20±0.03	0.24±0.07
	Left kidney(g)	0.24±0.03	0.23±0.05	0.23±0.08	0.25±0.06
	Brain(g)	0.44±0.06	0.45±0.03	0.46±0.02	0.43±0.05
	Lung(g)	0.23±0.07	0.29±0.06	0.23±0.04	0.25±0.03
	Spleen(g)	0.13±0.01	0.12±0.03	0.10±0.02	0.10±0.01
	Thymus(g)	0.09±0.01	0.10±0.02	0.09±0.01	0.09±0.02
	Gastrocnemius m.(g)	0.10±0.05	0.08±0.04	0.09±0.03	0.08±0.03
	Testis(g)	0.09±0.01	0.09±0.02	0.09±0.03	0.08±0.02
Female	Heart(g)	0.13±0.03	0.12±0.03	0.15±0.03	0.10±0.03
	Liver(g)	1.42±0.10	1.35±0.13	1.39±0.22	1.33±0.17
	Right kidney(g)	0.20±0.05	0.22±0.06	0.22±0.08	0.22±0.04
	Left kidney(g)	0.26±0.04	0.21±0.05	0.21±0.05	0.25±0.05
	Brain(g)	0.48±0.03	0.42±0.03	0.43±0.04	0.44±0.08
	Lung(g)	0.25±0.04	0.29±0.04	0.27±0.05	0.25±0.05
	Spleen(g)	0.10±0.02	0.11±0.03	0.10±0.02	0.12±0.02
	Thymus(g)	0.09±0.02	0.09±0.02	0.08±0.03	0.10±0.01
	Gastrocnemius m.(g)	0.10±0.02	0.10±0.03	0.08±0.02	0.09±0.03
	Ovary(g)	0.19±0.04	0.17±0.04	0.16±0.02	0.18±0.05

Data represent the mean±S.D.

Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).

**Table 6.** Hematological Values of Male and Female BALB/c Mouse in the 4 Weeks Toxicity Study of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Sex	Index	Group V	Group VI	Group VII	Group VIII	
Male	WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	2.88±0.79	2.88±0.17	3.12±0.45	3.04±0.54	
	RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	8.30±0.72	8.39±0.86	7.84±0.96	8.10±0.55	
	Hemoglobin(g/dl)	11.86±2.56	9.46±3.14	10.23±2.75	10.14±2.31	
	HCT(%)	31.28±1.4	30.77±2.46	32.01±3.33	29.56±1.27	
	Platelet( $10^3/\mu\text{l}$ )	893.32±26.12	970.33±29.70	881.11±29.85	863.91±65.32	
	MCV(fl)	50.89±6.38	48.73±4.41	51.58±7.20	56.04±5.08	
	MCH(pg)	13.11±3.79	11.35±2.53	13.55±0.20	12.61±2.58	
	MCHC(g/dl)	32.87±3.30	32.21±4.54	33.83±4.31	32.36±1.45	
	Female	WBC( $10^3/\mu\text{l}$ )	2.75±0.53	3.49±0.66	3.25±0.24	2.90±0.27
		RBC( $10^6/\mu\text{l}$ )	7.24±0.70	7.70±0.76	7.82±1.07	7.79±0.17
Hemoglobin(g/dl)		10.49±1.70	11.18±1.44	11.54±2.50	10.80±1.46	
HCT(%)		31.19±1.92	34.86±1.85	32.65±4.47	34.15±2.69	
Platelet( $10^3/\mu\text{l}$ )		953.11±130.32	952.37±61.50	920.40±64.63	878.30±61.09	
MCV(fl)		43.09±4.35	46.14±8.18	46.85±11.54	48.91±11.37	
MCH(pg)		15.07±2.45	13.16±3.81	16.06±2.76	11.69±3.49	
MCHC(g/dl)		33.31±2.17	31.70±2.45	32.17±3.19	33.70±4.07	

Data represent the mean±S.D.

Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day), WBC : White blood cell, RBC : Red blood cell, HCT : Hematocrit, MCV : Mean cell volume, MCH : Mean cell hemoglobin, MCHC : Mean cell hemoglobin concentration.

**Table 7.** Serum Biochemical Values of Male and Female BALB/c Mouse in the 4 Weeks Toxicity Study of *Aconitum ciliare Decaisne* Pharmacopuncture

Sex	Index	Group V	Group VI	Group VII	Group VIII	
Male	Total protein(g/dl)	4.83±0.49	4.66±0.40	4.18±0.52	4.78±0.45	
	Albumin(g/dl)	1.50±0.38	1.50±0.32	1.43±0.30	1.44±0.17	
	Total Bilirubin(mg/dl)	0.09±0.02	0.11±0.01	0.08±0.02	0.11±0.03	
	ALP(IU/l)	35.61±7.85	41.68±2.52	40.23±4.37	39.42±4.61	
	AST(IU/l)	49.20±8.00	48.93±3.19	51.16±5.73	53.26±7.15	
	ALT(IU/l)	19.69±1.85	19.04±3.19	18.61±2.48	20.71±4.22	
	Creatinine(mg/dl)	0.55±0.08	0.48±0.12	0.56±0.09	0.46±0.08	
	BUN(mg/dl)	21.37±3.48	19.07±2.73	19.03±5.32	17.58±0.91	
	Cholesterol(mg/dl)	158.45±31.86	146.80±17.39	140.95±26.33	128.55±19.80	
	Triglyceride(mg/dl)	65.12±2.91	57.79±6.05	60.14±12.19	62.02±11.24	
	Glucose(mg/L)	167.18±23.30	172.54±16.29	178.61±16.90	181.64±21.07	
	Female	Total protein(g/dl)	4.25±0.44	4.52±0.50	4.71±0.40	4.98±0.38
		Albumin(g/dl)	1.34±0.19	1.63±0.33	1.54±0.30	1.37±0.23
		Total Bilirubin(mg/dl)	0.09±0.01	0.11±0.03	0.09±0.01	0.10±0.01
ALP(IU/l)		41.44±4.49	39.34±5.09	37.66±6.29	38.97±6.73	
AST(IU/l)		54.27±5.61	50.38±4.25	54.44±5.25	51.84±4.69	
ALT(IU/l)		19.42±2.37	19.01±1.84	21.44±3.00	22.24±0.81	
Creatinine(mg/dl)		0.43±0.06	0.42±0.07	0.47±0.08	0.50±0.07	
BUN(mg/dl)		19.41±3.11	19.63±2.61	17.74±2.66	18.65±2.87	
Cholesterol(mg/dl)		141.46±20.24	158.22±13.71	140.73±26.14	175.59±29.25	
Triglyceride(mg/dl)		54.87±7.48	60.84±6.65	58.19±5.31	59.40±6.90	
Glucose(mg/L)	174.23±25.17	178.47±11.09	152.41±25.44	154.57±10.34		

Data represent the mean±S.D.

Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day), ALP : Alkaline phosphatase, AST : Aspartate aminotransferase, ALT : Alanine aminotransferase, BUN : Blood urea nitrogen.

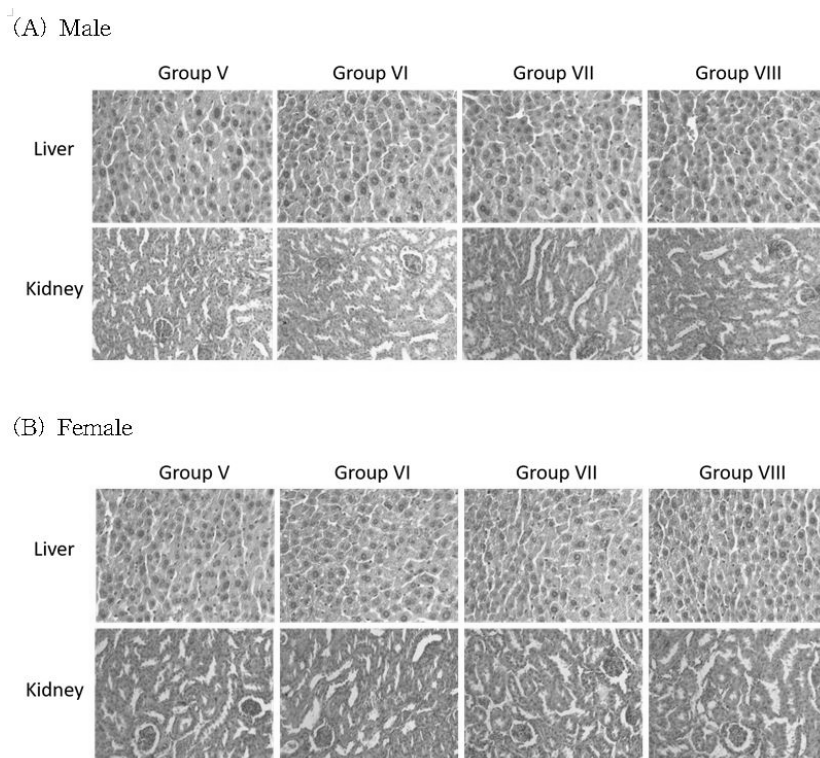
군(Group VI, VII, VIII) 사이에서 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다(Table 7). 이러한 결과는 암·수 BALB/c mouse 모두에서 동일하게 나타났다.

**7) 간과 신장의 조직병리학적 변화:** 간을 적출한 후 H&E 염색을 통하여 간조직을 관찰한 결과, 생리식염수를 투여한 대조군(Group V)의 간조직에서 간문맥과 실질이 정상적인 구조를 유지하고 있었으며 조직병리학적으로 정상적인 소견을 보여주었다. 초오약침을 4주간 투여한 저농도(Group VI), 중농도(Group VII), 고농도(Group VIII)군의 경우에는 간조직에서 간세포의 괴사, 염증세포 침윤, 혹은 지방변성 등의 변화를 발견할 수 없었으며 대조군(Group V)과 비교하여 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다(Fig. 3).

신장조직의 변화를 관찰한 결과에서는 대조군(Group V)과 저농도(Group VI), 중농도(Group VII), 고농도(Group VIII)의 초오약침을 투여한 군 모두에서 조밀한 세포질과 함께 정상적인 사구체(glomerulus), 곡세뇨관(convoluted tubule) 및 상피세포가 관찰되었으며 각 군 간에 유의성 있는 차이점은 발견되지 않았다. 초오약침을 투여한 실험군(Group VI, VII, VIII)에서 세뇨관의 팽창, 표피박리, 혹은 세포사멸 등의 변화는 발견되지 않았다. 이러한 결과는 암·수 BALB/c mouse 모두에서 동일하게 관찰되었다(Fig. 3).

## 고 찰

초오는 祛風除濕, 溫經止痛, 癱瘓止痛, 開筋痰하는 효능을 가지고 있어서 風寒濕痺, 關節疼痛, 心腹冷痛, 寒疝作痛, 坐骨神經痛, 中風半身不隨, 手足拘攣, 陰疽 등을 치료한다<sup>2)</sup>. <神農本草經>에서는 “主中風, 惡風, 洗洗出汗, 除寒濕痹, 咳逆上氣, 破積聚寒熱”, <名醫別錄>에서는 “主風濕, 丈夫腎濕囊癢, 寒熱歷節掣引腰痛, 不能行步, 癰腫膿結”, <藥性論>에서는 “能治惡風, 憎寒, 冷痰包心, 腸腹疝痛, 疥癬氣塊, 益陽事, 治齒痛, 主強志”, <本草綱目>에서는 “治頭風喉痺, 癰腫疔毒”, <本草綱目拾遺>에서는 “追風活血, 取根入藥酒” 등 초오의 효능에 대해 언급하고 있다<sup>5,11)</sup>. 하지만 초오는 독성을 가지고 있어서 臂麻痺, 舌麻痺, 手足麻痺, 惡心嘔吐, 精神不安등을 초래하며 중증일 때에는 意識不明, 顏面蒼白, 動悸, 呼吸促迫, 心臟搏動緩慢, 不整脈등을 일으키며 이외에 頻脈, 血壓低下, 瞳孔散大, 心電圖에서의 心室上部 및 心室性 期外收縮, 心臟搏動急速등이 나타나며 치료가 늦어지면 抽搐을 반복하다가 사망까지 이르기도 한다<sup>4,6,12)</sup>. 실제 임상에서 aconitine 중독에 관한 여러 보고<sup>8-10)</sup>도 있지만, 수치에 따라 초오의 독성을 감소시킬 수 있다. 김<sup>13)</sup>은 초오전탕액에서 aconitine이 검출되지 않았으나 rat에서 임상투여용량으로 2주간 투여한 결과 간에 조직학적인 변화와 약물대사 효소 CYP450 3A2의 활성증가의 영향이 있었고 고용량



**Fig. 3. Hematoxylin & Eosin Stained Liver And Kidney Tissues from Male And Female BALB/c Mouse Injected with *Aconitum ciliale* Decaisne Pharmacopuncture for 4 Weeks.**

The BALB/c mice were treated for 4 weeks and sacrificed. The Group V showed the normal morphology and *Aconitum ciliale* Decaisne pharmacopuncture treated groups(Group VI, VII, VIII) also had normal structures. (Magnification,  $\times 100$ ). Group V : Control group, Group VI : Low dose group(150 mg/kg/day), Group VII : Medium dose group(300 mg/kg/day), Group VIII : High dose group(600 mg/kg/day).

투여군에서는 조직의 hydropic change와 약물대사효소계의 활성이 전반적으로 상승하는 등의 조금 더 강한 독성이 나타났다고 보고하였다. 김<sup>14)</sup>, 한 등<sup>15,16)</sup>은 초오의 포제를 통해 독성물질의 감소 및 세포독성이 감소함을 보고하였으며, 김<sup>17)</sup>은 생초오를 투여했을 때 간, 신장 기능에 큰 손상을 미쳤으나 감두탕으로 법제한 초오는 간, 신장 기능에 미치는 손상이 크게 감소하였다고 보고하였다. 강<sup>18)</sup>은 알코올수침법에 의한 약침용 초오추출액이 급성독성증상이 나타나지 않았을 뿐만 아니라 피부자극, 안점막자극, 피하 및 근육자극 실험에서도 독성반응이 나타나지 않았고 LD50은 800 mg/kg에서도 산출되지 않았다고 보고하였다.

일반적으로 신체는 유해물질에 노출될 경우 노출 정도에 따라 어느 정도 차이는 있지만 생체의 기능과 구조에 영향을 주게 된다<sup>19)</sup>. 독성물질의 독성여부를 조사하기 위해서는 우선적으로 독성물질의 반복적 투여를 통해 체중과 장기 중량의 변화, 혈액학적, 조직병리학적 결과 등을 검사한 후 종합하여 독성물질의 독성여부를 판정하고 있다<sup>20)</sup>. 본 연구는 임상적으로 다양하게 활용 가능한 초오약침의 신체에 미치는 독성을 밝히려는 목적으로 BALB/c mouse에 약침을 단회 그리고 4주 동안 반복적으로 주입하고 체중변화, 각종 장기의 형태 및 무게변화, 혈액학적, 조직병리학적 변화를 살펴보았다.

LD50은 실험동물의 50%가 죽는 단일투여 용량을 의미한다. 1927년 Trevan이 고안한 개념으로 데이터의 성격에 따라 오차의 가능성은 있으나 현재까지 연구대상 물질의 1차 독성 지표로 널리 이용된다. 실험을 계획할 때 용량을 설정하는 수단으로 사용되며 가장 빠른 시간 내에 실험 물질의 독성을 평가하는 parameter로 흔히 활용된다<sup>21)</sup>. 본 연구에서는 LD50을 측정하는 실험에서 300, 600, 1,200, 2,400, 3,600 및 4,800 mg/kg을 1회 근육 시술한 결과 사망례가 관찰되지 않았다. 6,000 mg/kg의 농도에서 50%의 사망률을 나타내었다. 따라서 이번 실험에서의 초오약침의 LD50은 6,000 mg/kg으로 측정되었는데 이러한 결과는 앞서 ICR mouse와 SD rat을 이용한 초오약침의 독성연구<sup>18)</sup>에서 800 mg/kg의 농도 이상에서 연구를 하지 않아 LD50수치를 찾지 못한 한계를 보완하였다.

위와 같은 결과를 바탕으로 단회 독성 실험의 경우 300 mg/kg을 저용량군으로, 600 mg/kg을 중용량군으로, 1,200 mg/kg을 고용량군으로 설정하였으며, 4주 반복 실험의 경우에는 150 mg/kg을 저용량군으로, 300 mg/kg을 중용량군으로, 600 mg/kg을 고용량군으로 설정하였다. 모든 대조군에는 초오약침 투여군과 동일한 양의 생리식염수를 시술하였다. 그 결과 단회, 4주의 실험기간 동안 모든 농도의 초오약침 투여군에서 암·수 모두 사망 및 독성증상은

관찰되지 않았다.

초오약침 투여로 인한 체중의 변화를 살펴보면, 4주 반복 실험에서 암·수 모두 체중의 증가는 모든 농도에서 대조군(Group V)과 비교하여 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 이런 결과는 초오약침의 반복적인 투여는 체중변화에 유의성 있는 변화를 미치지 않는 것으로 확인되었다.

본 연구에서 4주의 초오 반복 투여가 끝난 후 실험한 BALB/c mouse로부터 WBC, RBC, Hemoglobin, HCT, Platelet, MCV, MCH, MCHC, Total cholesterol, Triglyceride, Glucose 등 각종 혈액학 및 생화학적 지표들을 측정하였다. 이러한 수치들의 변화는 4주 동안 초오약침을 반복투여한 후 대조군과 비교하여 미세한 변화들이 나타났으나 모두 유의성 있는 변화는 아니었으며 암/수컷에서 모두 동일하게 나타났다. 이러한 결과들은 반복적인 초오약침의 투여는 혈액학 및 생화학적 지표들의 유의성 있는 변화를 일으키지 않음을 나타내고 있는 것이다.

한편, 생체로 유입된 독성물질은 물질 그 자체 또는 그 물질의 대사산물이 표적장기로 이동하여 특정한 분자들과의 상호작용을 하거나 생물학적 환경에 변화를 주어 세포수준의 변화를 거쳐 조직학적 변화로 진행되며 독성 물질 종류나 노출정도에 따라 반응하는 세포내 표적분자나 반응 및 변화과정 등이 서로 달라서 나타나는 독성 양상도 다양한 현상을 보인다<sup>22)</sup>. 독성물질은 우리 몸에 들어온 후 간문맥을 거쳐 간으로 들어온다. 따라서 간에는 화학물질 대사효소가 풍부하지만 생체 내에 섭취된 대부분의 약물, 독성 물질을 대사하기 때문에 장해를 받을 가능성이 높다<sup>23,24)</sup>.

따라서 본 연구에서는 4주 동안 반복적인 초오약침 투여로 간에서 발생할 수 있는 변화를 알아보기 위해 실험한 BALB/c mouse의 혈액으로부터 생화학적 지표인 Total protein, ALB, Total bilirubin, ALP, AST, ALT를 측정하여 대조군과 비교하였다. 이러한 지표들의 변화를 측정한 결과, 4주 동안의 초오약침의 투여는 정상 대조군과 비교하여 암수 모두에서 유의성 있는 변화를 일으키지 못했다. 또한 4주 동안의 초오약침 투여 후 각 장기의 무게변화를 측정한 결과에서도 간의 무게에 있어 초오약침으로 인한 유의성 있는 변화는 나타나지 않았다. 나아가, 실제 실험한 BALB/c mouse의 간조직을 H&E염색을 통해 관찰한 결과, 4주의 반복투여 실험 모두에서 정상 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 나타나지 않았으며 간세포의 괴사, 염증세포 침윤, 혹은 지방변성 등의 변화를 발견할 수 없었다. 이러한 결과들은 4주 동안 반복적인 초오약침 투여로 인해 간에 독성을 일으키지 않음을 보여주는 것이라 할 수 있다.

간 이외에도 신장은 외인성 독성 물질 또는 독성이 있는 대사체



들의 무독화와 배설과정을 주관하여 체내의 항상성 유지에 필수적인 기능을 담당하는 기관<sup>25)</sup>으로 다양한 혈관이 분포하여 전체 심혈류량의 1/4이 신장의 혈관에 흐르고 있어 혈중 약물의 부작용을 받기 쉽고 물질을 농축시키는 특성이 있으며 화학물질 대사와 관련된 효소가 많이 분포하고 있어 다양한 효소반응을 일으킴으로 인해 독성 물질에 대한 감수성이 크다<sup>23,24)</sup>.

본 연구에서도 4주 동안 반복적인 초오약침 투여로 인해 신장의 손상이 발생하는지를 검증하기 위하여 실험한 BALB/c mouse의 혈액으로부터 신장과 관련된 생화학적 지표들인 BUN, Creatinine을 측정하여 대조군과 비교하였다. 본 연구에서 4주 간의 초오약침 투여 후 BUN과 Creatinine 수치를 측정한 결과, 암·수 모두에서 대조군과 비교하여 유의성 있는 변화가 나타나지 않았다. 신장의 무게를 측정하여 비교한 결과에서도 초오약침의 투여는 무게변화에 영향을 미치지 않았다. 신장조직을 H&E염색을 통해 관찰한 결과에서도 정상적인 신장조직 구성요소들이 발견되었으며 세뇨관 손상, 세포사멸 등의 변화는 발견되지 않았다. 이러한 결과들은 4주 동안 반복적인 초오약침 투여는 신장에 유해한 영향을 미치지 않는 것을 보여주는 것이라 할 수 있다.

그 외에도 심장, 폐, 뇌, 비장, 흉선, 암컷의 난소 혹은 수컷의 정소, 그리고 약침을 주입한 지점에 가깝게 위치한 비복근의 변화를 육안으로 관찰한 결과, 정상 대조군과 비교하여 초오약침을 농도별로 투여한 실험군에서 뚜렷한 이상병변은 관찰되지 않았으며, 무게를 측정하여 비교한 결과에서도 각 군간에 유의성 있는 변화는 관찰되지 않았다.

결과적으로 본 연구는 초오약침의 독성 실험을 통해 안전성을 연구하고자 BALB/c mouse에서 LD50, 단회 투여 독성 실험과 4주에 걸쳐 반복투여 독성 실험을 실시하여 일반증상, 체중측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 주요 장기의 육안 검사 및 중량 측정, 조직병리학적 검사를 관찰한 결과, 모든 농도에서 사망한 경우가 발생하지 않았으며, 일반증상과 체중에서 유의성 있는 변화를 일으키지 않았다. 또한, 심장, 간, 폐, 신장, 뇌, 비장, 흉선, 정소 또는 난소 및 비복근에서의 병변발생 및 무게변화에도 영향을 미치지 않았으며, 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사에서도 유해한 효과가 없었으며 간과 신장조직을 H&E염색을 통해 조직병리학적 으로 관찰한 결과에서도 정상적인 세포 구조를 보였다. 다만, 본 연구는 초오 약침의 4주 반복 투여 독성을 확인하였으나, 임상적으로 더 장기간 치료가 이루어질 수 있으므로 3개월 이상의 반복 투여 독성에 대한 연구가 필요하며, BALB/c mouse라는 특정 실험동물에서의 독성여부를 관찰한 실험으로써 실제 인체를 대상으로 한 좀 더 안전한 초오 약침의 임상작용을 위해서는 앞으로 추가적인

연구가 필요하다고 사료된다.

## 결 론

본 연구는 초오약침의 독성 실험을 통해 안전성을 연구하고자 BALB/c mouse에서 LD 50, 단회투여 독성 실험과 4주에 걸쳐 반복투여 독성 실험을 실시하여 일반증상, 체중측정, 혈액학적 검사, 혈액생화학적 검사, 주요 장기의 육안 검사 및 중량 측정, 조직병리학적 검사를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 초오약침의 LD50은 BALB/c mouse에서 6,000 mg/kg로 측정되었다.
  2. 초오약침을 300, 600, 1,200 mg/kg의 농도로 BALB/c mouse에 단회 투여 후 사망 여부를 관찰한 결과, 모든 농도에서 사망한 경우가 발생하지 않았다.
  3. 초오약침을 150, 300, 600 mg/kg의 농도로 BALB/c mouse에 4주간 매일 반복 투여 후 일반증상과 체중변화를 관찰한 결과 유의한 변화를 일으키지 않았으며 심장, 간, 폐, 신장, 뇌, 비장, 흉선, 정소 또는 난소 및 비복근에서의 병변발생 및 무게변화에도 영향을 미치지 않았다. 또한 혈액학적 검사 및 혈액생화학적 검사에서도 유해한 효과가 없었으며 간과 신장조직을 H&E염색을 통해 조직병리학적 으로 관찰한 결과에서도 정상적인 세포 구조를 보였다.
- 본 연구 결과를 종합해보면, 초오약침의 600 mg/kg이하의 농도에서 반복투여로 인한 유해함은 없을 것으로 사료되며 향후 더 장기적인 실험 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## References

1. Yu CG, Gwon GR. The Bibliographic studies on Aconiti ciliare Tuber and Radix Aconiti. Journal of pharmacopuncture institute. 2001 ; 4(2) : 87-93.
2. Oriental medical schools Herbology Compilation Committee. Herbology. Seoul. Yeongrimsa. 2007 : 311-2.
3. Lee SJ. Bonchogangmok. Beijing. People's health publisher. 1977 : 1174-83.
4. Kim CO, Kim HD. State examination Herbology. Seoul. Gunja publisher. 2007 : 114.
5. Kim CM, Shin MK, Lee KS, Ahn DK. The encyclopedia of oriental herbal medicine. Seoul. Jungdam publisher. 2004 :

- 4280-6.
6. Jang WS. Clinical Herbology. Gyeongsan. Daegu Haany University publishing department. 2015 : 290-1.
  7. Lee JM, Jang WS, Seo BI. A philological study on poisoning of Aconiti radix. The Journal of Applied Oriental Medicine. 2009 ; 9(1) : 23-41.
  8. Lim TH, Park KY. A case of aconitine poisoning with transient tetraplegia and hypocalcemia. Kor J of Med. 1998 ; 55(6) : 1093-6.
  9. Choi DI, Jin YH, Lee JB, Aconitine Intoxication Following Ingestion of Folk Recipes Containing Aconitum Species. J of The Kor Society of Emergency Med. 2002 ; 13(2) : 175-180.
  10. Kim MR. Ventricular Arrhythmia Following Aconitine Ingestion-2 Case Reports-. J of The Korean Society of Clinical Toxicology. 2006 ; 4(2) : 180-6.
  11. Lee SI. Herbology. Seoul. Daeseong publisher. 1981 : 551.
  12. Yang CY, Jeong B, Go RM, Lee WC, Ban JG, Jeong GM. Poisonous traditional Chinese medicine counsel of play. Beijing. zhongguoyiyao science and technology publishing house. 1993 : 116-20.
  13. Kim YK. Studies on the Liver Toxicities with Different Dosage of Wild Aconiti Tuber Decoction. Seoul : Kyung Hee University. 2003.
  14. Kim HK, Lee HW, Jeon WK. Effects of Various Processing methods on the Contents of Alaloids in the Cho O(Aconiti Cilare Tuber). Kor J. Pharmacogn. 2002 ; 33(4) : 296-300.
  15. Korea Institute of Orignal Medicine. A Study of Various Processing methods on the contents of Aconiti Cliare Tuber. Korea Institute of Orignal Medicine Report. 2001 : 1-30.
  16. Korea Institute of Orignal Medicine. A Study on the cytotoxicity under before and after Various Processing methods of Aconiti Cliare Tuber. Korea Institute of Orignal Medicine Report. 2001 : 31-9.
  17. Kim JH, Kang SB. Effect of Radix Aconiti manufactured by Gamdutang on hepatic and renal fuction of rats. The Journal of Korean Medicine. 1994 ; 15(1) : 117-29.
  18. Kang SI. Experimental studies on the Safety of Aconiti Tuber Extract Solution for herb-acupuncture. Seoul : Kyung Hee University. 1996
  19. Connell DW, Yu QJ, Verma V. Influence of exposure time on toxicity-An overview. Toxicology. 2016 ; 29 : 355-6.
  20. Barlow SM, Greig JB, Bridges JW, Carere A, Carpy AJ, Galli CL et al. Harard identification by methods of animal-based toxicology. Food Chem Toxicology. 2002 ; 40 : 145-91.
  21. Choi SY. Toxicology. Ulsan. Ulsan University publishing department. 1987 : 189-207, 298-9.
  22. Young Na Yum, Jae Ho Oh, Sheen Hee Kim, Myung Sil Hwang, Gi Dae Kim, Ji On Kim, Ki Taek Nam, Tae Seok Kang, Ki-Hwa Yang, and Dae Hyun Cho. Toxicity Study of 3-Monochloropropane-1,2-diol using Proteomics Technique. The annual report of national toxicology program in Korea. 2003 ; 2(1) : 1-8.
  23. Jung SY, Kim GY, Kim BH, Jo YB. Toxicology. Seoul. Donghwa technology. 2000 : 15-21 , 118-94.
  24. Ko YS, Yun SH, Kim MK, Song YS, Shin BC. Literatural Study on Toxicity of Herbs used in <Bangyakhappyeon>. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2005 ; 19(5) : 1120-8.
  25. Kim SY, Mun AR. Kidney toxicity assessment for the biomarkers discovery research. J of Pharmacology. 2010 ; 21 : 33-42.