

HPLC-PDA를 이용한 오약순기산 중 6종 성분의 동시분석

서창섭, 김정훈, 신현규
한국한의학연구원 한약기초연구그룹

ABSTRACT

Simultaneous Analysis of Six Constituents in *Oyaksungi-san* using HPLC-PDA

Chang-Seob Seo, Jung-Hoon Kim, Hyeun-Kyoo Shin
Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine

Objectives : *Oyaksungi-san*(Wuyaoshunqisan) has been used for treatment of stroke and rheumatoid arthritis in Korea. In this study, a simple and accurate high-performance liquid chromatography(HPLC) method was established for simultaneous determination of six main components, liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin, and glycyrrhizin in *Oyaksungi-san*, a traditional Korean herbal prescription.

Methods : The analytical column for separation of six constituents was used a Gemini C₁₈ column maintained at 40°C. The mobile phase consisted of two solvent systems, 1.0% (v/v) acetic acid in H₂O (A) and 1.0% (v/v) acetic acid in acetonitrile (B) by gradient flow. The flow rate was 1.0 mL/min and the detector was a photodiode array (PDA) set at 254 nm for glycyrrhizin, 280 nm for liquiritin, naringin, hesperidin, and neohesperidin, and 320 nm for ferulic

-
- 교신저자 : 신현규
 - 대전시 유성구 유성대로 1672 한국한의학연구원 한약기초연구그룹
 - Tel : 042-868-9464 E-mail : hkshin@kiom.re.kr
 - 접수 : 2012/ 10/ 29 수정 : 2012/ 12/ 03 채택 : 2012/ 12/ 06

acid.

Results : Calibration curves were acquired with r^2 -values ≥ 0.9998 . The results of recovery test were 91.58%-105.90% with a relative standard deviations (RSDs, %) value less than 2.0%. The values of RSD for intra- and inter-day precision were 0.03%-1.72% and 0.03%-1.63%, respectively. The contents of the six compounds in *Oyaksungi-san* were 0.33-9.30 mg/g.

Conclusions : The newly established HPLC method will be helpful to improve quality control of *Oyaksungi-san*.

Key word : Simultaneous analysis, *Oyaksungi-san*(Wuyaoshunqisan), HPLC-PDA, method validation

1. 서 론

烏藥順氣散은宋代『太平惠民和劑局方』¹⁾에 처음 수록된 처방으로 “一切風氣가 攻注四肢하여 骨節疼痛하거나 遍身頑癩”하는데 사용되는 처방, 즉, 풍기가 사지를 공격해서 뼈마디가 아프거나 전신에 마비감이 생기는 경우에 사용되는 처방이다.^{2,3)} 烏藥順氣散은 기재된 의서마다 구성 약재에 대한 용량 차이는 있지만 마황(Ephedrae Herba), 진피(Citri Unshius Pericarpium), 오약(Linderae Radix), 천궁(Cnidii Rhizoma), 백지(Angelicae Dahuricae Radix), 백강잠(Bombycis Corpus), 지각(Aurantii Fructus Immaturus), 길경(Platycodi Radix), 건강(Zingiberis Rhizoma), 감초(Glycyrrhizae Radix), 생강(Zingiberis Rhizoma Crudus) 및 대조(Zizyphi Fructus)의 12종으로 구성되어 있다.⁴⁾

본 처방의 실험적 연구로 소염, 진통 및 항염증 작용^{5,6)}, 항원 비특이적 면역반응과 항원 특이적

면역 반응 활성화⁷⁾, 혈압강하 및 혈관이완^{8,9)}, 항비만¹⁰⁾ 및 허혈성 뇌손상 이후 운동기능과 인지기능 향상¹¹⁾ 등에 대한 효과가 보고되었으며, 한약재의 안전성과 관련하여 중금속, 잔류농약 및 잔류이산화황에 대한 연구^{12,13)}와 급성 독성¹⁴⁾에 대한 연구가 보고되었다.

본 연구에서는 생약제제의 품질관리에 기초 자료를 제공하고자 한의학에서 중풍 및 류마티스 관절염 등에 널리 사용되는 한방제제 중 하나인 烏藥順氣散을 선정하였다. 본 처방의 구성 약재 중 liquiritin과 glycyrrhizin(감초), ferulic acid(천궁) 및 naringin, hesperidin 및 neohesperidin(진피 및 지각) 등 6종의 성분(Fig. 1)을 대상으로 광다이오드 어레이(photodiode array, PDA)가 결합된 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 다성분 동시정량법의 확립과 분석법에 대한 validation을 실시하였다.

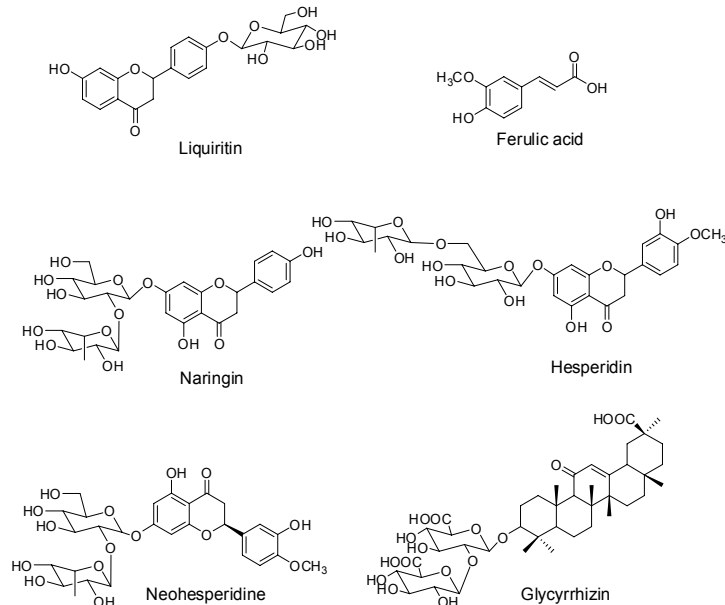


Fig. 1. Chemical structures of six constituents in *Oyaksungi-san*.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 烏藥順氣散의 구성 한약재인 마황(*Ephedrae Herba*), 진피(*Citri Unshius Pericarpium*), 오약(*Linderae Radix*), 천궁(*Cnidii Rhizoma*), 백지(*Angelicae Dahuricae Radix*), 백강잠(*Bombycis Corpus*), 지각(*Aurantii Fructus Immaturus*), 길경(*Platycodi Radix*), 건강(*Zingiberis Rhizoma*), 감초(*Glycyrrhizae Radix*), 생강(*Zingiberis Rhizoma Crudus*), 대조(*Zizyphi Fructus*)는 (주)옴니허브(Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX(Jecheon, Korea)에서 규격품을 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 이제현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)와 서영배 교수(Daejeon University, Daejeon, Korea) 2인의 전문가로부터 감별 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본(2008-KE27-1~2008-KE27-12)은 한국한의학연구원 한약기초연구그룹에 보관하였다.

2. 시약 및 기기

표준물질인 liquiritin, ferulic acid 및 glycyrrhizin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan), naringin은 Sigma-Aldrich(St Louis, MO, USA) 및 hesperidin과 neohesperidin은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd(Chengdu, China)로부터 각각 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 naringin은 95% 이상이며, 다른 5종의 표준품은 모두 98% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 메탄올, 아세트나이트릴 및 물은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 초산은 특급시약으로 Junsei(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

함량분석을 위한 HPLC는 pump(LC-20AT), on-line degasser(DGU-20A₃), column oven(CTO-20A), autosampler(SIL-20AC) 및 PDA detector(SPD-M20A)로 구성된 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈(Kyoto, Japan)를 사용하였고, 분석 data는 LCsolution software(Version 1.24)를 이용하여 처리하였다. 시료 추출을 위해 (주)경서기계산업의 초고속 진공 저온 농축 추

출기(Cosmos 660, Incheon, Korea)를 사용하였다.

3. 표준액의 조제

Liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin 등 6종의 표준품에 대한 표준용액은 무게를 정확하게 측정한 후 메탄올로 녹여 모두 1.0 mg/mL의 농도로 조제한 후 4°C에 보관하면서 사용 전에 희석하여 사용하였다.

4. 오약순기산 추출물 및 검액의 조제

烏藥順氣散의 구성한약재를 Table 1과 같이 무게 비율로 배합(총 시료 양 약 10.0 kg)하여 약탕기(Cosmos 660, Incheon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배(100 L)로 첨가하여 100°C에서 2시간煎탕한 후 농축 및 동결건조하여 약 2.4 kg(수율 24.4%)의 추출물을 얻었다. 추출물 400 mg을 정확히 측정 후 물을 넣어 20 mL로 맞춘 후 SmartPor

GHP(0.2 um pore size, Woongki Science, Seoul, Korea)로 여과하여 검액으로 하였다.

5. HPLC 분석조건

烏藥順氣散 내 주요성분인 liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin을 정량분석을 위해 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈를 사용하여 분석하였다. 동시 분석을 위해 사용된 칼럼은 Phenomenex사의 Gminin C₁₈(5 um, 4.6×150 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 mL/min으로 흘러주었으며 주입량은 10 uL였다. 이동상은 1.0% (v/v) 초산이 함유된 물 (A)과 1.0% (v/v) 초산이 함유된 아세토나이트릴 (B)을 사용하여 Table 2와 같이 기울기 용매조건으로 흘러주었으며, 검출파장은 254 nm, 280 nm 및 320 nm에서 검출하였다.

Table 1. Composition of *Oyaksungji-san*

Latin name	Amount (g)	Company of purchase	Source
Ephedrae Herba	5.625	HMAX	China
Citri Unshius Pericarpium	5.625	Omnierb	Jeju, Korea
Linderae Radix	5.625	HMAX	China
Cnidii Rhizoma	3.75	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Angelicae Dahuricae Radix	3.75	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Bombycis Corpus	3.75	HMAX	China
Aurantii Frucuts Immaturus	3.75	HMAX	China
Platycodi Radix	3.75	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Zingiberis Rhizoma	1.875	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Glycyrrhizae Radix	1.125	HMAX	China
Zingiberis Rhizoma Crudus	3.75	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Zizyphi Fructus	3.75	Omnierb	Yeongcheon, Korea
Total amount	46.125		

Table 2. Condition of Mobile Phase for Chromatographic Separation

Time (min)	Solvent A (%) ^a	Solvent B (%) ^b
0	85	15
40	35	65
45	0	100
50	0	100

^a1.0% (v/v) acetic acid in H₂O^b1.0% (v/v) acetic acid in acetonitrile

6. 분석법 검증(Method validation)

새롭게 설정된 동시분석법에 대하여 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(limit of detection: LOD), 정량한계(limit of quantitation: LOQ), 반복성(repeatability), 회수율(recovery) 및 정밀성(precision) 등을 판단하여 분석방법을 검증하였다.

1) 직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계

Liquiritin, ferulic acid 및 glycyrrhizin의 검량선은 0.39-50.00 mg/mL, naringin, hesperidin 및 neohesperidin의 검량선은 3.13-400.00 mg/mL, 1.95-250.00 mg/mL 및 1.56-200.00 mg/mL로 피크 면적에 대하여 8가지 농도에 대해서 각각 작성하였다. 작성된 검량선은 상관계수 r^2 를 구하여 직선성을 판단하였으며, 상관계수 r^2 값이 0.999 이상인 경우 검량선으로 사용하였다. 또한 검출한계와 정량한계는 신호(signal: S) 대 잡음(noise: N) 비를 이용하여 각각 3과 10을 기준으로 정하였다.

2) 회수율 시험

정확성 평가를 위한 회수율 시험은 오약순기산 시료에 측정하고자 하는 6종의 주요성분 용액을 저, 중 및 고농도의 일정 농도를 첨가한 후 분석을 통해 첨가된 주요성분의 양을 확인하였다. 회수율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

회수율 (%) = (표준품이 첨가된 시료의 양 - 표준품이 첨가되지 않은 시료의 양) / 첨가한 시

료의 양 × 100

3) 반복성

피크면적과 머무름 시간에 대한 반복성은 표준 용액을 가지고 시간의 변화에 따른 기계의 변화 정도를 보기 위하여 6회 주입하여 면적과 머무름 시간의 반복성을 확인하였다.

4) 정밀성 시험

확립된 분석법의 정밀성은 동일한 검체에 대해 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 상대 표준편차(%RSD)로 판단한다. 정밀성 평가는 일내와 일간 시험을 통하여 실시하였다. 각각의 실험은 3가지 농도의 혼합표준용액을 5회 반복실험을 통하여 얻은 결과의 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 분석조건의 확립

烏藥順氣散의 구성 약재 중 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin, 천궁의 ferulic acid, 진피와 지각의 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등 6종의 성분을 분석 대상으로 각각 1.0% (v/v) 초산이 함유된 물 (A)과 아세트나이트릴 (B)의 이동상을 이용하여 기울기 용매 조건으로 분리능 1.17이상으로 35분 이내에 모두 분리하였다. PDA 검출 파장은 glycyrrhizin은 254 nm, liquiritin, naringin, hesperidin 및 neohesperidin 은 280 nm에서 검출하였으며, ferulic acid는 320 nm에서 각각 검출하였다. 검액에서의 피크 확인은 표준물질의 피크 머무름 시간과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. Liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin 등 6종의 성분에 대한 피크 머무름 시간은 11.44분, 12.41분, 13.41분, 13.90분, 14.59분 및 30.21분에 각각 검출되었다(Fig. 2).

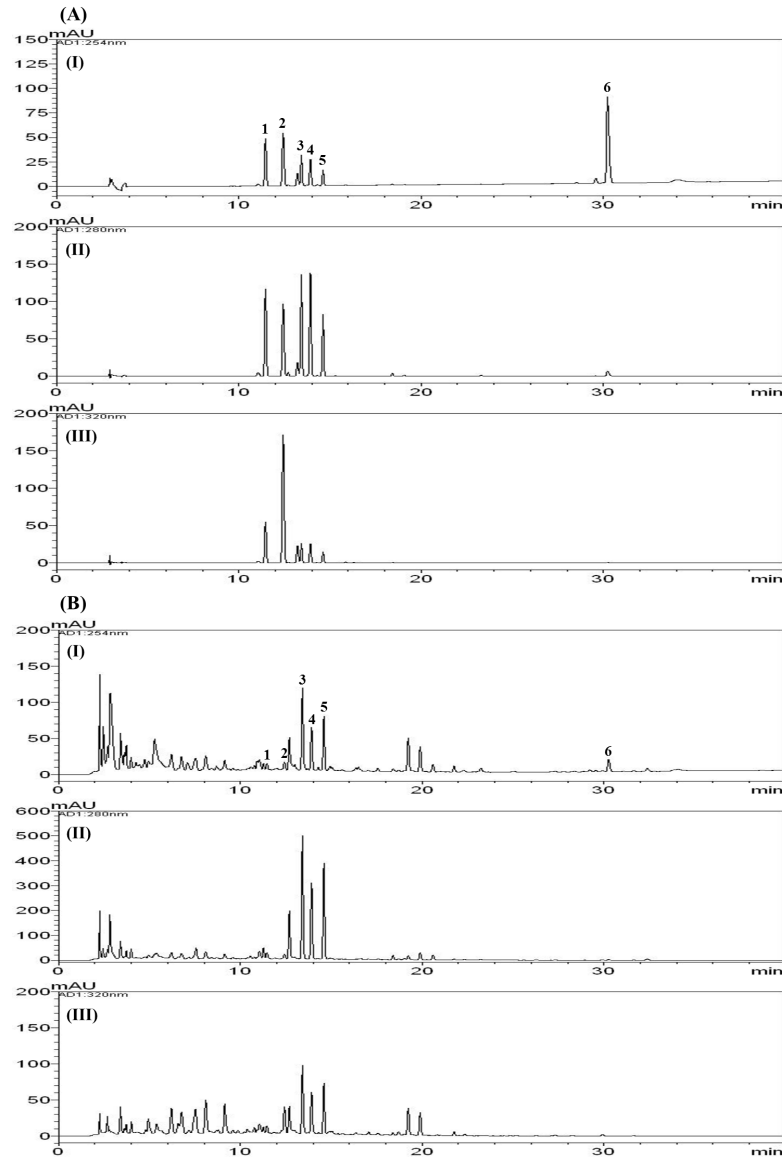


Fig. 2. HPLC chromatogram of a standard mixture (A) and *Oyaksungi-san* extract (B) at 254 nm (I), 280 nm (II), and 320 nm (III). Liquiritin (1), ferulic acid (2), naringin (3), hesperidin (4), neohesperidin (5), and glycyrrhizin (6)

2. 분석방법의 직선성, 검출한계 및 정량한계

Liquiritin, ferulic acid, naringin, hesperidin, neohesperidin 및 glycyrrhizin 등 6종의 성분에 대한 검량선 작성 결과 상관 계수 (r^2)값이 0.9998 이

상으로 1.0에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 이들 성분에 대한 검출한계는 0.019-0.088 mg/mL로 나타났으며, 정량한계는 0.062-0.293 mg/mL로 나타났다(Table 3).

3. 회수율

烏藥順氣散에 표준물질의 서로 다른 3가지 농도(저, 중, 고농도)로 첨가한 후 측정된 회수율 시험 결과 liquiritin은 95.00-100.14%, ferulic acid는

97.24-99.75%, naringin은 91.58-94.50%, hesperidin은 98.47-100.82%, neohesperidin은 99.66-105.90% 및 glycyrrhizin이 96.11-97.16%로 나타났으며, 상대표준편차도 6성분 모두 2.00% 이하로 나타났다(Table 4).

Table 3. Linearities, Correlation Coefficients, LODs, and LOQs for Marker Compounds (n=3)

Compound	Linear range (mg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient	LOD (mg/mL)	LOQ (mg/mL)
Liquiritin	0.39-50.00	16085.82	3886.14	0.9998	0.084	0.279
Ferulic acid	0.39-50.00	46969.88	-9733.35	0.9998	0.019	0.062
Naringin	3.13-400.00	16249.71	46309.18	0.9998	0.072	0.239
Hesperidin	1.95-250.00	17380.77	30132.79	0.9999	0.074	0.247
Neohesperidin	1.56-200.00	20898.85	29610.91	0.9998	0.056	0.188
Glycyrrhizin	0.39-50.00	8294.45	2548.76	0.9999	0.088	0.293

Table 4. Recovery Levels of the Six Components in *Oyaksungi-san*

Compound	Original mean level (mg/mL)	Spiked level (mg/mL)	Detected mean level (mg/mL)	Recovery mean (%)	RSD (%)
Liquiritin	9.05	2.00	11.06	100.14	1.00
		5.00	13.95	97.85	1.22
		10.00	18.55	95.00	0.63
Ferulic acid	3.11	1.00	4.08	97.24	0.75
		2.00	5.06	97.70	1.92
		5.00	8.09	99.75	0.74
Naringin	93.66	18.00	110.67	94.50	0.84
		45.00	135.38	92.72	0.54
		90.00	176.08	91.58	0.23
Hesperidin	58.89	12.00	70.99	100.82	0.80
		30.00	88.43	98.47	0.27
		60.00	118.32	99.05	0.19
Neohesperidin	52.66	8.00	61.00	104.24	1.47
		20.00	72.59	99.66	0.77
		40.00	95.02	105.90	0.63
Glycyrrhizin	8.99	2.00	10.91	96.11	1.28
		5.00	13.84	97.16	1.53
		10.00	18.60	96.17	0.92

4. 반복성

6종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 반복성 측정 결과 6성분 모두 상대표준편차가 1.02%

및 0.07% 이내로 각각 양호한 반복성을 나타내었다(Table 5).

Table 5. Repeatability of Six Components on Retention Time and Peak Area

Compound	RSD of retention time (%)	RSD of peak area (%)
Liquiritin	0.07	0.98
Ferulic acid	0.05	1.00
Naringin	0.06	1.02
Hesperidin	0.06	0.94
Neohesperidin	0.06	0.95
Glycyrrhizin	0.02	0.98

5. 정밀성 및 정확성

일내와 일간을 통한 6종 성분의 정밀성 시험 결과 0.03-1.72% 및 0.03-1.63%로 각각 나타났으며, 정확성은 일내 및 일간 모두 95.76-103.28%로 나타났다(Table 6).

Table 6. Precision of Six Compounds in *Oyaksungi-san*

Compound	Spiked conc. (mg/mL)	Intra-day			Inter-day		
		Observed conc. (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)	Observed conc. (mg/mL)	Precision (%)	Accuracy (%)
Liquiritin	2.00	2.04	1.17	101.93	2.07	0.23	103.28
	5.00	5.09	1.41	101.75	5.04	0.59	100.77
	20.00	9.95	0.32	99.49	9.97	0.15	99.68
Ferulic acid	1.00	0.99	1.15	99.32	0.99	0.66	98.81
	2.00	1.98	1.70	98.78	1.95	1.63	97.67
	5.00	5.01	0.22	100.22	5.02	0.24	100.42
Naringin	18.00	18.26	0.27	101.42	18.28	0.46	101.53
	45.00	45.29	0.21	100.64	45.19	0.28	100.43
	90.00	89.80	0.06	99.78	89.85	0.05	99.83
Hesperidin	12.00	12.18	0.54	101.51	11.96	0.43	99.64
	30.00	29.82	0.11	99.41	29.67	0.32	98.88
	60.00	60.05	0.03	100.09	60.18	0.06	100.29
Neohesperidin	8.00	8.18	0.47	102.21	7.97	1.13	99.59
	20.00	19.15	0.14	95.76	19.33	0.26	96.64
	40.00	40.39	0.05	100.97	40.34	0.03	100.86
Glycyrrhizin	2.00	1.99	1.10	99.39	2.01	0.63	100.26
	5.00	5.04	1.72	100.78	5.14	0.88	102.90
	10.00	9.98	0.40	99.83	9.93	0.20	99.27

6. 함량분석

烏藥順氣散을 설정된 HPLC-PDA 동시 분석법으로 6종 성분에 대한 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 烏藥順氣散 추출물에 대하여 liquiritin이

0.85-0.87 mg/g, ferulic acid가 0.33 mg/g, naringin이 9.19-9.30 mg/g, hesperidin이 5.96-6.00 mg/g, neohesperidin이 5.65-5.70 mg/g 및 glycyrrhizin이 0.91-0.93 mg/g로 나타났다(Table 7).

Table 7. Analytical Results (mg/g) of the Six Compounds in *Oyaksungi-san*

Batch (#)	Content (mg/g)								
	Liquiritin			Ferulic acid			Naringin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	0.86	0.013	1.462	0.33	0.007	2.074	9.19	0.039	0.427
2	0.87	0.019	2.151	0.33	0.002	0.587	9.30	0.049	0.526
3	0.85	0.013	1.551	0.33	0.002	0.555	9.26	0.049	0.530
Batch (#)	Content (mg/g)								
	Hesperidin			Neohesperidin			Glycyrrhizin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	5.96	0.076	1.274	5.65	0.024	0.429	0.93	0.022	2.428
2	6.00	0.077	1.290	5.70	0.031	0.537	0.91	0.003	0.361
3	5.98	0.079	1.317	5.68	0.027	0.471	0.91	0.004	0.387

IV. 결 론

烏藥順氣散을 구성하는 마황, 진피, 오약, 천궁, 백지, 백강잠, 지각, 길경, 건강, 감초, 생강, 대조의 12가지 구성 약재 중 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin, 천궁의 ferulic acid, 진피와 지각의 naringin, hesperidin 및 neohesperidin 등 6종의 성분에 대하여 동시 분석을 실시하였다. 확립된 분석법에 대한 검증으로 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 재현성, 정확성 및 정밀성 등의 실험을 통하여 분석법에 대한 신뢰를 높이고자 하였다. 분석 결과 烏藥順氣散에는 진피와 지각으로부터 유래된 naringin, hesperidin 및 neohesperidin과 같은 flavonoid 계열의 물질이 다량 함유되어 있음을 알 수 있다. 이상의 결과로 설정된 분석법은 烏藥順氣散의 품질관리에 있어서 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준한방처방EBM구축사업 (K12031)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 陳師文. 태평혜민화제국방. 중국:인민위생출판사, 1985:44.
2. Lee CB, Oh MS. Anti-inflammation, anti-development and curative effects of *Oyaksunkisangamibang* on the collagen-induced arthritis in rats. *J Korean Oriental Med.* 2005;26:176-87.
3. Yang MS, Shin MS, An HL. The effects of *Ohyaksungi-san*(*Wuyaoshunqi-san*) and electrical acupuncture on nerve regeneration after crush injury in rat sciatic nerve. *J. Oriental Rehab. Med.* 2008;18:25-37.
4. 한국한의학연구원 한약기초연구그룹. 표준한방처방 의약품 정보 2011. 대전:한국한의학연구원, 2011:203-4.
5. Moon YH, Lee DI, Lee SY. Studies on the anti-inflammatroy and analgesic activities of *Ohyaksungisan*. *Kor J Pharmacogn.* 1996;27:184-9.
6. Kim Y, So HS, Kim JK, Park C, Lee JH, Woo WH, Cho KH, Moon BS, Park R. Anti-inflammatory effect of *Oyaksungisan* in

- peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:1037-41.
7. Jung DY, Ha HK, Lee HY, Lee JA, Lee JK, Huang DS, Shin HK. Stimulation of the immune response by herbal formulas for wind-cold and heat pain symptom. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2010;24:616-23.
 8. Jun SB, Kim SH, Kim BT, Lim RC. Effects of Oyaksoonkisan and Kamiyakssoonkisan on hypertension and pulse rate. *J Korean Oriental Med.* 1997;18:267-77.
 9. Shin H, Ko H, Kim H. Effects of *Oyaksoongi-san* extract on hypertension and common carotid artery. *Korean J Oriental Med.* 2004;10:79-92.
 10. Jung SY, Lee MJ. The effects of *Ohyaksunki-san* (*Wuyaoshunqisan*) on increasing body fat of rat induced by high fat diet. *J Oriental Rehab Med.* 2007;17:23-39.
 11. Ryu KJ, Choi JB, Shin MS, Kim SJ. The effects of *Ohyaksunki-san*(*Wuyaoshunqisan*) on cognition and motor function recovery after ischemic brain injury in rat. *J Oriental Rehab Med.* 2008;18:1-17.
 12. Seo CS, Huang DS, Lee JK, Ha HK, Chun JM, Um YR, Jang S, Shin HK. Concentration of hazardous substances of before/after a decoction - In prescription of high frequency - *Kor J Herbology.* 2009;24:13-20.
 13. Seo CS, Kim JH, Ha H, Lee MY, Lee JK, Lee NH, Lee HY, Lee JA, Lee SL, Shin HK. Study on transfer rate of hazardous materials in herbal medicine prescriptions. *J Korean Oriental Med.* 2010;31:9-19.
 14. Lee JH, Lee JH, Ma JY. Acute toxicity study on *Ohyaksungi-san*(*Wuyaoshunqi-san*) extracts in mice. *Korean J Oriental Med.* 2011;17:167-73.