

HPLC-PDA를 이용한 보중익기탕 중 Liquiritin, Nodakenin, Hesperidin 및 Glycyrrhizin의 동시분석

서창섭 · 김정훈 · 신현규[#]

한국한의학연구원 한약방제연구그룹

(Received February 18, 2013; Revised May 27, 2013; Accepted June 18, 2013)

Simultaneous Determination of Liquiritin, Nodakenin, Hesperidin and Glycyrrhizin in Bojungikgi-tang Using HPLC-PDA

Chang-Seob Seo, Jung-Hoon Kim and Hyeun-Kyoo Shin[#]

Herbal Medicine Formulation Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

Abstract — Bojungikgi-tang has been widely used for enhancement of physical fitness in Korea. The convenient, simple, and accurate high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for simultaneous determination of four marker compounds, liquiritin, nodakenin, hesperidin, and glycyrrhizin in Bojungikgi-tang (Buzhongyiqi-tang in Chinese, Hochuekkito in Japanese), a traditional Korean herbal prescription. The column for optimizing HPLC separation was used a Gemini C₁₈ column at column oven temperature of 40°C with 1.0% (v/v) aqueous acetic acid (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, 280 nm, and 335 nm. Calibration curves of four components were acquired with r^2 values ≥ 0.9999 . The recoveries were found to range 92.11~105.68% with relative standard deviations (RSDs, %) value less than 2.50%. The RSD values of intra- and inter-day precision were 0.07~2.50% and 0.16~1.99%, respectively. The contents of liquiritin, nodakenin, hesperidin and glycyrrhizin in Bojungikgi-tang were 3.85~3.92 mg/g, 2.27~2.32 mg/g, 4.14~4.19 mg/g, and 3.39~3.45 mg/g, respectively. The established simultaneous analysis method will be effective for quality control of Bojungikgi-tang.

Keywords □ HPLC-PDA, Bojungikgi-tang, simultaneous analysis, validation

보중익기탕은李의『東垣十書』중『脾胃論』에 처음 수록된 처방으로 황기, 감초, 인삼, 백출, 당귀, 진피, 승마 및 시호의 8종으로 구성되어 있다.¹⁾ 또한 補中益氣하고 升陽舉陷하는 효능이 있으며, 脾胃의 氣虛로 인한 身熱有汗, 頭痛惡寒, 渴喜溫飲, 少氣懶言, 體倦肢軟, 色蒼白, 大便稀이나 氣虛下陷으로 인한 脫肛, 子宮下垂, 久瀉, 久痢, 久 등의 諸證을 치료하는 것으로 알려져 오늘날까지 많이 사용되어지고 있는 처방이다.¹⁾ 보중익기탕은 한의원 다빈도 처방 순위 2위,²⁾ 건강보험 요양급여 사용 실적 6위³⁾ 및 한방의료기관 한약제제 구비율 9위⁴⁾ 등으로 한방의료기관에서 사용빈도가 높은 처방이다.

본 처방의 실험적 연구로 항알러지,⁵⁻⁷⁾ 항위염,⁸⁾ 항암,^{9,10)} 스트레스 개선,^{11,12)} 및 간보호¹³⁾ 등 다양한 효능 연구가 보고되었다. 또한 한약 처방의 안전성과 관련하여 중금속, 잔류농약 및 잔

류이산화황 등과 같은 위해물질에 대한 연구¹⁴⁾와 급성 독성¹⁵⁾에 대한 연구가 보고되었다.

본 연구에서는 한약처방의 품질관리를 위한 기초 자료를 제공하고자 한방의료기관에서 사용빈도가 높은 처방 중 하나인 보중익기탕을 선정하였다. 본 처방의 구성 약재 중 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin, 당귀의 nodakenin 및 진피의 hesperidin 등 4종(Fig. 1)의 성분을 대상으로 광다이오드 어레이(photodiode array, PDA)가 결합된 고성능액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)를 이용하여 다성분 동시 정량법의 확립과 분석법에 대한 검증을 실시하였다.

실험방법

실험재료 - 본 실험에 사용된 보중익기탕의 구성 한약재인 황기(Astragali Radix), 인삼(Ginseng Radix), 당귀(Angelicae Gigantis Radix), 진피(Citri Unshius Pericarpium), 및 시호(Bupleuri Radix)는 (주)옴니허브(Yeongcheon, Korea)에서 구입

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 042-868-9464 (팩스) 042-864-2120
(E-mail) hkshin@kiom.re.kr

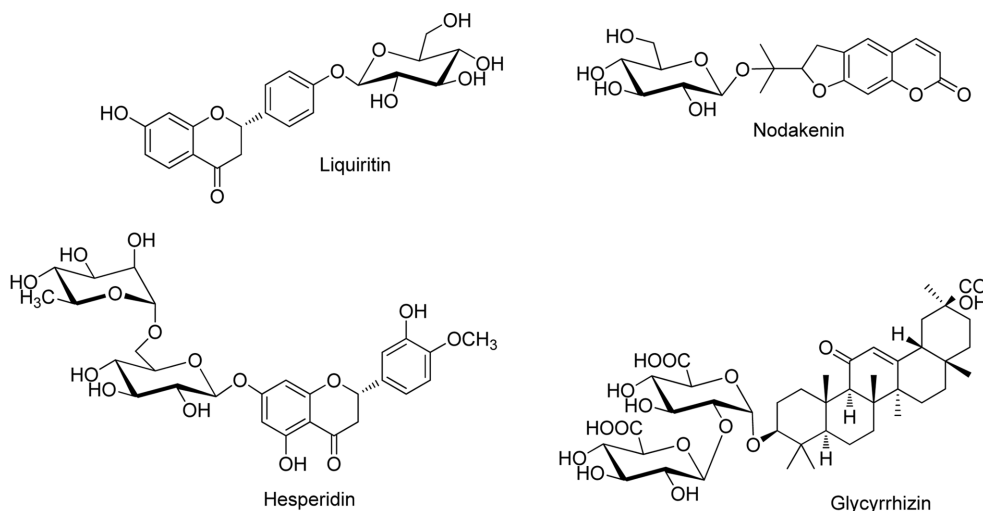


Fig. 1 – Chemical structures of four constituents in Bojungikgi-tang

하였으며, 감초(Glycyrrhizae Radix et Rhizome), 백출(Atractylodis Rhizoma Alba) 및 승마(Cimicifugae Rhizome)는 (주)HMAX(Jecheon, Korea)에서 규격품을 각각 구입하였다. 구입한 한약재는 이제현 교수(Dongguk University, Gyeongju, Korea)로부터 감별 받은 후 사용하였으며, 각각의 구성 한약재들의 표본(2008-KE12-1~2008-KE12-8)은 한국한의학회 연구원 한약방제연구그룹에 보관하였다.

시약 – HPLC 정량분석을 위하여 표준물질로 사용한 liquiritin과 nodakenin은 NPC Biotechnology(Yeongi, Korea)에서 구입하였으며, hesperidin과 glycyrrhizin은 Chengdu Biopurify Phytochemicals Ltd.(Chengdu, China)와 Wako Pure Chemical Industries, Ltd.(Osaka, Japan)로부터 각각 구입하였다. 각 표준물질의 순도는 모두 98% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 물과 아세트나이트릴은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, 초산은 특급시약으로 Junsei(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

기기 – 함량분석을 위한 HPLC는 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈(Kyoto, Japan)로 pump(LC-20AT), on-line degasser(DGU-20A₃), column oven(CTO-20A), autosampler(SIL-20AC) 및

PDA detector (SPD-M20A)로 구성되어 있다. 분석 data는 LCsolution software(Version 1.24)를 이용하여 처리하였으며, 시료 추출을 위해 경서기계산업의 초고속 진공 저온 농축 추출기(Cosmos 660, Incheon, Korea)를 사용하였다.

표준용액의 조제 – Liquiritin, nodakenin, hesperidin 및 glycyrrhizin 등 4종의 표준품에 대한 표준용액은 무게를 정확하게 측정된 후 메탄올로 녹여 모두 1.0 mg/ml의 농도로 조제한 후 냉장에 보관하였다.

보중익기탕 추출물 및 검액의 조제 – 보중익기탕의 구성한약재를 Table I과 같이 무게 비율로 배합(총 시료 양; Table I×153배 =약 3.5 kg)하여 추출기(Cosmos 660, Incheon, Korea)에 넣고, 물을 시료의 10배(35 l)로 첨가하여 100°C에서 2시간 전탕 한 후 농축 및 동결건조 하여 약 890.6 g(수율 25.4%)의 추출물을 얻었다. HPLC 분석을 위하여 추출물 200 mg을 정확히 취한 후 물을 넣어 20 ml로 맞춘 후 syringe filter(0.2 μm pore size, Woongki Science, Seoul, Korea)하여 검액으로 하였다.

HPLC 분석조건 – 보중익기탕 내 주요성분의 정량분석을 위해 Shimadzu사의 LC-20A 시리즈를 사용하였다. Liquiritin, nodakenin, hesperidin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분의 분리를

Table I – Composition of Bojungikgi-tang

Latin name	Amount (g)	Company of purchase	Source
Astragali Radix	5.625	Omniherb	Jeongseon, Korea
Glycyrrhizae Radix et Rhizome	3.75	HMAX	China
Ginseng Radix	3.75	Omniherb	Geumsan, Korea
Atractylodis Rhizoma Alba	3.75	HMAX	China
Angelicae Gigantis Radix	1.875	Omniherb	Yeongcheon, Korea
Citri Unshius Pericarpium	1.875	Omniherb	Jeju, Korea
Cimicifugae Rhizome	1.125	HMAX	Hwasun, Korea
Bupleuri Radix	1.125	Omniherb	China
Total amount	22.875		

위해 사용된 칼럼은 Gemini C₁₈(5 µm, 4.6×150 mm, Torrance, CA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40°C로 유지하였다. 유속은 1.0 ml/min으로 흘려주었으며 주입량은 10 µl였다. 이동상은 1.0%(v/v) 초산이 각각 함유된 물(A)과 아세트나이트릴(B)을 사용하여 (A)/(B)=95/5(0분) → (A)/(B)=30/70(40분) → (A)/(B)=0/100(45분) → (A)/(B)=0/100(50분) → (A)/(B)=95/5(55분)와 같이 기울기 용매조건으로 흘려주었다. 분석 성분은 254 nm, 280 nm 및 335 nm에서 각각 검출하였다.

분석법 검증 - 보중익기탕의 동시분석을 위해 설정된 분석법에 대하여 직선성(linearity), 범위(range), 검출한계(limit of detection; LOD), 정량한계(limit of quantitation; LOQ), 반복성(repeatability), 회수율(recovery), 정밀성(precision) 및 시스템적합성(suitability) 등을 판단하여 분석방법을 검증하였다.¹⁶⁾

가) 직선성 및 범위 - Liquiritin, hesperidin 및 glycyrrhizin의 검량선은 3.91~250.00 µg/ml, nodakenin의 검량선은 1.95~125.00 µg/ml의 범위에서 표준용액을 이용하여 피크 면적에 대하여 7가지 농도에 대해서 각각 작성하였다. 작성된 검량선은 상관계수(r^2)를 구하여 직선성을 판단하였으며, 상관계수 값이 0.999 이상인 경우 검량선으로 사용하였다.

나) 검출한계 및 정량한계 - 분석 대상 성분의 검출 및 정량 가능한 최소 농도를 확인하기 위해 검출한계와 정량한계를 설정하였으며, 이들은 신호(signal; S) 대 잡음(noise; N) 비를 이용하여 각각 3과 10을 기준으로 정하였다.

다) 회수율 시험 - 정확성 평가를 위한 회수율 시험은 보중익기탕 시료에 측정하고자 하는 4종의 주요성분 용액을 저, 중 및 고농도의 일정 농도를 첨가한 후 분석을 통해 첨가된 주요성분의 양을 확인하였다.

라) 반복성 - 피크면적과 머무름 시간에 대한 반복성은 표준용액을 가지고 시간의 변화에 따른 기계의 변화 정도를 보기 위하여 6회 주입하여 면적과 머무름 시간의 반복성을 상대표준편차(%RSD)를 계산하여 확인하였다.

마) 정밀성 시험 - 확립된 분석법의 정밀성은 동일한 검체에 대해 실험 환경 변동에 따른 결과의 변화 정도를 상대표준편차로 판단한다. 정밀성 평가는 일내와 일간 시험을 통하여 실시하였다. 각각의 실험은 3가지 농도의 혼합표준용액을 5회 반복실험을 통하여 얻은 결과의 상대표준편차를 구하여 평가하였다.

바) 시스템적합성 시험 - 확립된 분석법의 시스템적합성은 이론단수(theoretical plate number; N), 용량인자(capacity factor; k), 상대 머무름(relative retention; α) 및 분리도(resolution; R_s) 등으로 평가하였다.

결과 및 고찰

분석조건의 확립

보중익기탕의 주요 구성 생약 중 대한약전9개정¹⁷⁾을 기준으로 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin, 인삼의 ginsenoside Rb1, 당귀

Table II - Linear range, regression equation, correlation coefficients, LODs, and LOQs for marker compounds (n=3)

Compound	Linear range(µg/ml)	Regression equation (y=ax+b) ^a	Correlation coefficient (r^2)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Liquiritin	3.91~250.00	y=20514.0x-7654.6	1.0000	0.10	0.32
Nodakenin	1.95~125.00	y=37085.0x-13738.0	0.9999	0.08	0.26
Hesperidin	3.91~250.00	y=20889.0x-7846.3	1.0000	0.10	0.32
Glycyrrhizin	3.91~250.00	y=9010.1x-6021.0	1.0000	0.23	0.75

^ay means peak area (mAU), x means concentration (µg/ml).

Table III - Recovery levels of the four components in Bojungikgi-tang

Compound	Original amount (µg/ml)	Spiked amount (µg/ml)	Detected amount (µg/ml)	Recovery ^a (%)	RSD (%)
Liquiritin	33.79	7.00	40.54	96.50	1.11
		16.00	50.70	105.68	0.41
		32.00	63.26	92.11	0.30
Nodakenin	11.74	2.00	13.75	100.56	1.53
		6.00	17.87	102.17	1.40
		12.00	24.05	102.53	1.07
Hesperidin	35.62	7.00	42.48	98.04	1.10
		16.00	51.76	100.87	2.39
		32.00	68.51	102.79	1.34
Glycyrrhizin	59.08	6.00	65.12	100.65	1.24
		15.00	73.67	97.24	1.57
		30.00	87.92	96.14	1.11

^aRecovery(%)=(Detected amount-Original amount)/Spiked amount×100.

Table IV – Repeatability of four components on retention time and peak area

No. (#)	Retention time (min)			
	Liquiritin	Nodakenin	Hesperidin	Glycyrrhizin
1	17.801	18.729	19.809	33.441
2	17.801	18.725	19.807	33.965
3	17.792	18.712	19.791	34.251
4	17.801	18.718	19.796	34.465
5	17.817	18.734	19.814	34.648
6	17.81	18.74	19.803	34.756
Mean	17.80	18.73	19.80	34.25
SD	0.01	0.01	0.01	0.49
RSD (%)	0.05	0.05	0.04	1.43

No. (#)	Peak area (mAU)			
	Liquiritin	Nodakenin	Hesperidin	Glycyrrhizin
1	680048	423876	747940	526971
2	686308	416335	732530	528409
3	687137	427663	733038	525312
4	686782	421215	732341	525281
5	687010	419549	735255	525581
6	682687	422168	732161	523498
Mean	684995.33	421801.00	735544.17	525842.00
SD	2945.01	3849.56	6177.58	1674.65
RSD(%)	0.43	0.91	0.84	0.32

의 nodakenin, 진피의 hesperidin 및 시호의 saikosaponin A 등 6종의 성분에 대하여 동시분석을 실시하고자 하였다. 동시분석을 위해 1.0%(v/v) 초산이 각각 함유된 물(A)과 아세트나이트릴(B)의 이동상을 이용하여 기울기 용매 조건으로 분석 조건을 설정한 결과 감초의 liquiritin과 glycyrrhizin, 당귀의 nodakenin 및 진피의 hesperidin 등 4종을 제외한 인삼의 ginsenoside Rb1과 시호의 saikosaponin A는 검출이 되지 않았다. 따라서 본 분석법에서는 triterpenoid류의 물질로서 UV 발색단이 약하여 검출의 한계가 있는 ginsenoside Rb1과 saikosaponin A를 제외한 4종

Table V – Precision of four compounds in Bojungikgi-tang

Compound	Spiked conc. (µg/ml)	Intra-day			Inter-day		
		Observed conc. (µg/ml)	Precision (%)	Accuracy (%)	Observed conc. (µg/ml)	Precision (%)	Accuracy (%)
Liquiritin	7.00	6.70	1.00	95.70	6.84	1.87	97.76
	16.00	17.66	0.29	110.40	17.45	1.08	109.05
	32.00	31.23	0.07	97.61	31.31	0.21	97.84
Nodakenin	2.00	1.98	1.52	99.00	1.97	1.34	98.57
	6.00	5.99	0.53	99.87	6.10	1.22	101.62
	12.00	12.01	0.09	100.06	11.96	0.32	99.63
Hesperidin	7.00	6.85	0.70	97.86	6.89	0.69	98.38
	16.00	15.85	2.50	99.09	15.48	0.78	96.78
	32.00	32.11	0.59	100.33	32.28	0.16	100.88
Glycyrrhizin	6.00	6.15	1.36	102.48	6.15	1.99	102.44
	15.00	15.07	1.66	100.45	15.04	0.99	100.25
	30.00	29.94	0.39	99.79	29.95	0.21	99.84

Table VI – System suitability testing of four marker compounds

Compound	Theoretical plate number (N)	Capacity factor (k')	Relative retention (α)	Resolution (Rs)
Liquiritin	37043	4.98	1.05	1.76
Nodakenin	26021	5.40	1.06	1.83
Hesperidin	24588	5.52	1.06	1.83
Glycyrrhizin	35547	10.19	1.83	22.91

의 성분에 대하여 동시분석법을 실시하였다. PDA 검출 파장은 glycyrrhizin은 254 nm, liquiritin과 hesperidin은 280 nm 및 nodakenin은 335 nm에서 각각 검출하였다. 검액에서의 피크 확인은 표준물질의 피크 머무름 시간과 UV 흡수 파장을 비교하여 확인하였다. Liquiritin, nodakenin, hesperidin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대한 피크 머무름 시간은 21.04분, 21.91분, 22.96분 및 39.81분에 각각 검출되었다(Fig. 2).

분석방법의 직선성, 검출한계 및 정량한계

Liquiritin, nodakenin, hesperidin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대하여 피크면적(y축)과 표준용액의 농도(x축)로 검량선을 작성한 결과 상관 계수(r^2) 값이 0.9999 이상으로 1.0에 가까운 양호한 직선성을 나타내었다. 또한 이들 성분에 대한 검출한계와 정량한계의 범위는 0.08~0.23 µg/ml 및 0.26~0.75 µg/ml로 각각 나타났다(Table II).

회수율

설정된 분석법의 정확성을 확인하기 위한 회수율 시험 결과 liquiritin은 92.11~105.68%, nodakenin은 100.56~102.53%, hesperidin은 98.04~102.79% 및 glycyrrhizin이 96.14~100.65%로 나타났으며, 상대표준편차도 4성분 모두 2.50% 미만으로 나타났다(Table III).

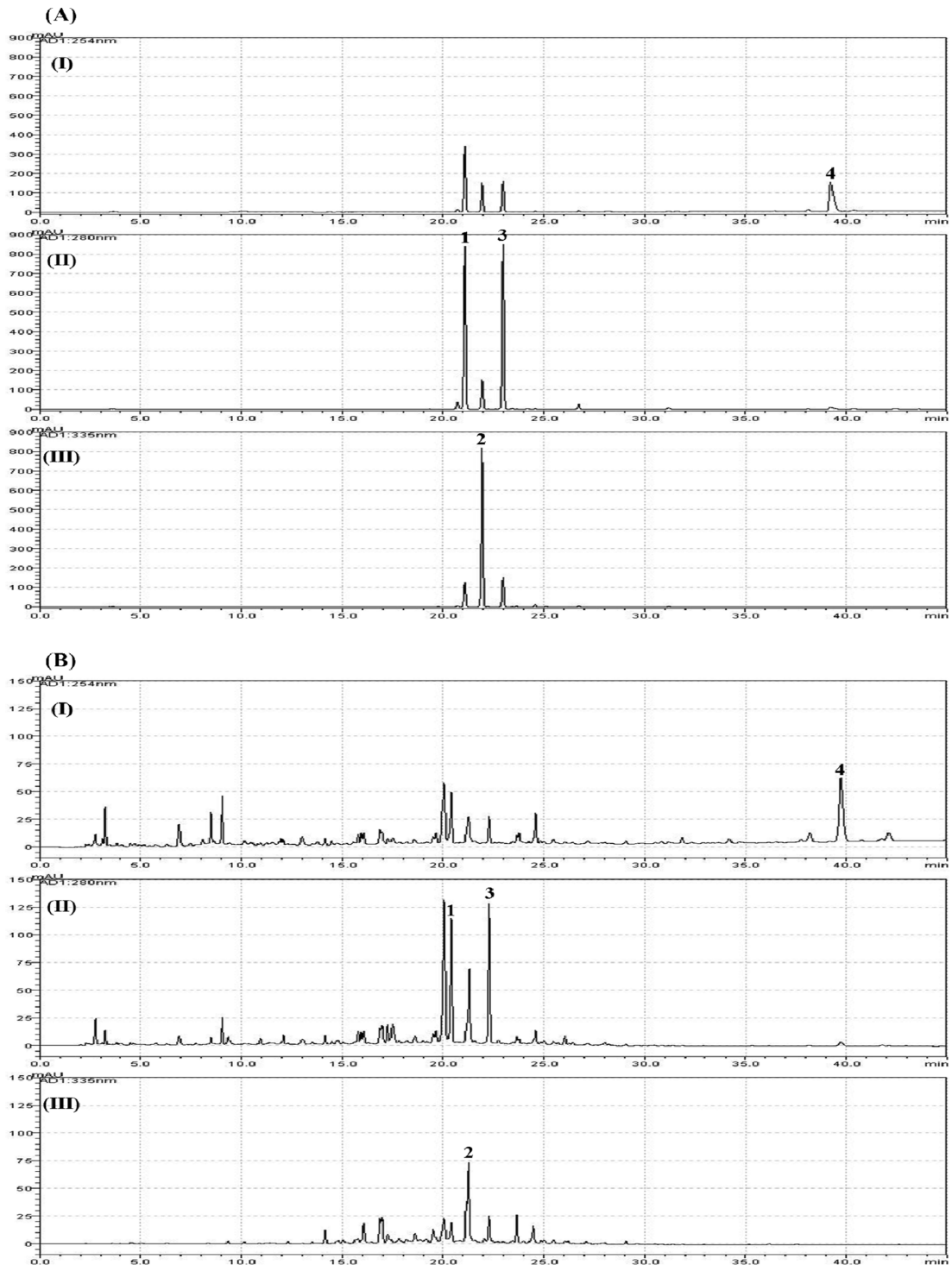


Fig. 2 – HPLC chromatograms of a standard mixture (A) and Bojungikgi-tang sample (B) at 254 nm (I), 280 nm (II), and 335 nm (III). Liquiritin (1), nodakenin (2), hesperidin (3), and glycyrrhizin (4).

반복성

4종 성분의 피크 면적과 머무름 시간에 대한 반복성 측정 결과 4성분 모두 상대표준편차가 1.00% 및 1.50% 이내로 각각 양호한 반복성을 나타내었다(Table IV).

정밀성

3가지 농도의 표준용액을 첨가하여 일내와 일간 시험을 통해 5회 측정하여 정밀성을 평가하였다. 4종 성분의 정밀성 시험 결과 일내 시험에서 상대표준편차가 0.07~2.50%로 나타났으며, 일

Table VII – Analytical results (mg/g) of the four compounds in Bojungikgi-tang

Batch (#)	Content (mg/g)											
	Liquiritin			Nodakenin			Hesperidin			Glycyrrhizin		
	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)	Mean	SD	RSD (%)
1	3.92	0.04	0.89	2.28	0.09	3.97	4.14	0.04	1.08	3.39	0.02	0.70
2	3.85	0.06	1.54	2.32	0.04	1.71	4.15	0.04	0.96	3.44	0.04	1.27
3	3.85	0.02	0.51	2.27	0.09	4.07	4.19	0.13	3.11	3.45	0.10	2.83

간 시험에서는 0.16~1.99%의 상대표준편차를 나타내었다. 일내 및 일간 시험 모두 상대표준편차가 3.0% 이내로 양호한 정밀성을 나타내었다(Table V).

시스템적합성

Liquiritin, nodakenin, hesperidin 및 glycyrrhizin 등 4종의 성분에 대하여 확립된 동시분석법의 시스템적합성 인자 중 이론단수는 24588~37043, 용량인자는 4.98~10.19, 상대 머무름은 1.05~1.83 및 분리도는 1.76~22.91로 평가되었다(Table VI).

함량분석

HPLC-PDA를 이용하여 보중익기탕 중 4종의 성분에 대하여 설정된 동시 분석법으로 함량을 분석하였다. 함량 분석 결과 liquiritin이 3.85~3.92 mg/g, nodakenin이 2.27~2.32 mg/g, hesperidin이 4.14~4.19 mg/g 및 glycyrrhizin이 3.39~3.45 mg/g로 나타났다(Table VII).

결 론

보중익기탕을 구성하는 황기, 감초, 인삼, 백출 당귀, 진피, 승마 및 시호의 8가지 구성 약재 중 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin, 당귀의 nodakenin 및 진피의 hesperidin 등 4종에 대하여 동시 분석을 실시하였다. 확립된 분석법에 대한 검증으로 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 재현성, 정확성, 정밀성 및 시스템적합성 등의 실험을 통하여 분석법에 대한 검증을 하였다. 분석 결과 보중익기탕에는 liquiritin과 hesperidin과 같은 flavonoid 계열의 물질이 다량 함유되어 있음을 알 수 있다. 이상의 결과로 설정된 분석법은 보중익기탕의 품질관리와 생리활성 연구에 있어서 중요한 기초자료로 이용될 수 있을 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '한약 처방의 과학적 근거 기반 구축 사업(K13030)'에 의해 수행되었으며 이에 감

사드립니다.

참고문헌

- 1) 한의과대학 방제학교수 공편저 : 방제학, 영림사, 서울 p. 279 (2003).
- 2) 식품의약품안전청 : 한국인의 한약재 복용실태 조사 연구, 식품의약품안전청, 서울 p. 91 (2006).
- 3) Chung, H. G. and Song, J. S. : 2008 National health insurance statistical yearbook, National Health Insurance Corporation, Health Insurance Review & Assessment Service, Seoul p. 290 (2009).
- 4) Bak, Y. H., Huang, D. S. and Shin, H. K. : The analysis of herbal medicine preparations equipped in traditional Korean medical clinics. *Korean J. Oriental Med. Prescription* **18**, 43 (2010).
- 5) Ishimitsu, R., Nishimura, H., Kawauchi, H., Kawakita, T. and Yoshikai, Y. : Dichotomous effect of a traditional Japanese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang on allergic asthma in mice. *Int. Immunopharmacol.* **1**, 857 (2001).
- 6) Kabayashi, H., Mizuno, N., Kutsuna, H., Teramae, H., Ueoku, S., Onoyama, J., Yamanaka, K., Fujita, N. and Ishii, M. : Hochuekki-to suppresses development of dermatitis and elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Drugs Exp. Clin. Res.* **29**, 81 (2003).
- 7) Gao, X. K., Fuseda, K., Shibata, T., Tanaka, H., Inagaki, N. and Nagai, H. : Kampo medicines for mite antigen-induced allergic dermatitis in NC/Nga mice. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2**, 191 (2005).
- 8) Matsumoto, T., Moriya, M., Kiyohara, H., Tabuchi, Y. and Yamada, H. : Hochuekkito, a Kampo (traditional Japanese herbal) medicine, and its polysaccharide portion stimulate G-CSF secretion from intestinal epithelial cells. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **7**, 331 (2010).
- 9) Harada, M., Seta, K., Ito, O., Tamada, K., Li, T., Terao, H., Takenoyama, M., Kimura, G. and Nomoto, K. : Concomitant immunity against tumor development is enhanced by the oral administration of a Kampo medicine, Hochuekki-to (TJ-41: Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang). *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **17**, 687 (1995).

- 10) Cho, J. M., Sato, N. and Kikuchi, K. : Prophylactic anti-tumor effect of Hochu-ekki-to (TJ41) by enhancing natural killer cell activity. *In Vivo* **5**, 389 (1991).
- 11) Hong, N. D., Chang, I. K., Lee, S. I. and Kim, N. J. : Studies on the efficacy of combined preparation of crude drugs (XVI). Effect of "Bojungiki-tang" on the central nervous system. *Kor. J. Pharmacogn.* **15**, 115 (1984).
- 12) Yamaoka, Y., Kawakita, T. and Nomoto, K. : Protective effect of a traditional Japanese medicine, Bu-zhong-yi-qi-tang Japanese name: Hochu-ekki-to, on the restraint stress-induced susceptibility against *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacol.* **48**, 35 (2000).
- 13) Han, Y. J., Lee, S. D., Choi, J. H., Park, J. G., Park, H. M. and Jang, I. S. : Effects of high frequency herbal medication administrations on the liver functions in rats - Focusing on Sipjeondaebo-tang, Yukmijihwang-tang, Bojungikgi-tang, and Ojeoksan - *J. Korean Oriental Med.* **27**, 78 (2006).
- 14) Seo, C. S., Huang, D. S., Lee, J. K., Ha, H. K., Chun, J. M., Um, Y. R., Jang, S. and Shin, H. K. : Concentration of hazardous substances of before/after a decoction in prescription of herbal medicine - In prescription of tonify yang and tonify yin - *Korean J. Oriental Med. Prescription* **17**, 53 (2009).
- 15) Kim, J. T. : Single oral dose toxicity test of Bojungikkitang (Buzhongyiqi-tang) aqueous extract in ICR mice. *Kor. J. Oriental Preventive Med. Soc.* **15**, 21 (2011).
- 16) 식품의약품안전청 : 의약품등 시험방법 밸리테이션 가이드라인 (개정판), 식품의약품안전청, 청원 p. 1 (2012).
- 17) Korean Pharmacopoeia Committee : The Korean Pharmacopoeia, 9th eds. Shinilbooks, Seoul, p. 1095 (2008).