

자하거 약침의 지표물질 선정 및 분석법 벨리데이션

박상원*⁺ · 이재웅⁺ · 이진호*⁺ · 하인혁*⁺ · 변장훈* · 정범환* · 정화진⁺ · 이인희⁺
김민정⁺ · 김은지⁺
자생한방병원 한방재활의학과*, 자생의료재단 척추관절연구소⁺

Identification of Standard Compound of Ja-ha-guh Pharmacopuncture and Validation of Analytic Methods

Sang-won Park, K.M.D.*⁺, Jae-woong Lee, M.S.⁺, Jin-ho Lee, K.M.D.*⁺, In-Hyuk Ha, K.M.D.*⁺, Jang-hoon Byun, K.M.D.*⁺, Bum-hwan Jung, K.M.D.*⁺, Hwa-jin Jung, M.S.⁺, In-hee Lee, M.S.⁺, Min-Jeong Kim, B.S.⁺, Eun-Jee Kim, M.S.⁺

Department of Korean Rehabilitation Medicine, Ja-Seng Korean Medicine Hospital*, Jaseng Spine and Joint Research Institute, Jaseng Medical Foundation⁺

본 연구는 (재)한국한방산업진흥원
응역과제(응역명 : 약침약제 규격
표준화사업- 약침약제 제조공정 및
품질관리 방안 위탁연구용역, 공고번호:
제20150602383호)에 의해 수행된
과제로 연구비 지원에 감사드립니다.

RECEIVED November 30, 2015
REVISED December 10, 2015
ACCEPTED December 10, 2015

CORRESPONDING TO
Sang-won Park, Jaseng Spine and
Joint Research Institute, Jaseng
Medical Foundation, 858, Eonju-ro,
Gangnam-gu, Seoul 06017, Korea

TEL (02) 3218-2250
FAX (02) 3218-2244
E-mail genesispsw@naver.com

Copyright © 2016 The Society of
Korean Medicine Rehabilitation

Objectives Despite the increasing use of Ja-ha-guh (*Hominis-placenta*) pharmacopuncture in rehabilitative medicine field, its standard compound has yet to be investigated. The purpose of this study is to provide standardization for future studies and increase satisfaction of patients by utilizing standard pharmacopuncture.

Methods Alanine and leucine were selected as potential standard compounds. LC/MS was used to devise an analytic method. This analytic method was subject to validation. According to validation guideline of Korea Food and Drug Administration, the specificity, linearity, precision, range, quantitative limits, detection limits and accuracy were measured. With this analysis, 3 lots of Ja-ha-guh pharmacopuncture were analyzed.

Results Because the specificity, linearity, precision, range, quantitative limits, detection limits and accuracy meet criteria of the guideline, the analytic method was validated. It was found that Ja-ha-guh pharmacopuncture contained 211.02 ± 7.28 ug/ml of alanine and 372.03 ± 7.58 ug/ml of leucine.

Conclusions Both alanine and leucine appear to be suitable standard compounds. These results are likely to contribute to further standardization of Ja-ha-guh for medical use. (**J Korean Med Rehab 2016;26(1):33-40**)

Key words *Hominis-placenta*, Pharmacopuncture, Standardization, LC/MS, alanine, leucine

서론»»»»

자하거(*Hominis-placenta*)는 건강한 사람의 태반을 건조한 것으로 性은 溫, 無毒하고 味는 甘鹽하여 肺, 肝, 腎 經으로 들어가 補氣, 養血, 益精하여 虛損勞嗽, 勞熱骨蒸, 咳嗽, 咯血, 盜汗, 遺精, 陽萎, 婦女血氣不足, 氣血雙虛,

精虧不寧, 産後乳汁少, 癩癩 등을 치료하는 효능이 있고¹⁾, 폐결핵, 신경쇠약, 빈혈, 기관지천식 등 만성질환에 응용되고 있다.

최근의 자하거 약침에 대한 임상적 연구는 소화불량증²⁾, 피로개선³⁾, 안면경련⁴⁾, 중풍 환자의 하지 경직⁵⁾, 마미증 후군 FBSS (Failed Back Surgery Syndrome)환자⁶⁾ 등에

효과가 있다고 보고되고 있으며, 임상적으로 다양한 재활 의학 분야의 질병에 활발하게 활용되고 있다.

자하거는 대학약전 외 한약(생약)규격집에 등재되었던 약제로 자하거의 규격으로 성상, 등급, 포제방법만 제시되었으며, 위품검사를 위한 Molisch's test만 진행되었다. 2005년 9월에 바이러스 안전성 미확보를 이유로 대학약전 외 한약(생약)규격집에서 삭제되고⁷⁾, 2006년 원료의약품 신고대상 의약품으로 지정되면서 현재는 바이러스 부정시험 등을 통해 바이러스가 활성화되지 않도록 관리된 한약조제용 자하거를 한약의 원료로 사용하고 있다. 그리고 한약조제용 자하거를 이용하여 한의사의 처방에 의해 자하거 약침을 조제하여 사용하고 있다.

그러나 한약조제용 자하거 및 자하거 약침의 지표성분 함량분석 기준은 정해진 것이 없어, 이에 alanine과 leucine을 자하거 약침의 지표성분으로 설정하고, 자하거 약침에 적합한 분석법을 개발해서 분석법 밸리데이션을 실시하여 그 결과를 발표하고자 한다.

재료 및 방법»»»»

1. 기기 및 시약

표준품으로 사용된 alanine과 leucine은 Sigma Aldrich (USA)에서 구입하였고, 각각 98%, 98.5%의 순도를 사용하였다. 정량분석에 사용된 Water, Acetonitrile (ACN), Methanol은 HPLC grade (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA), Trifluoroacetic acid는 JUNSEI chemical (JAPAN)을 사용하였다.

성분 분석에 사용된 기기는 SHIMADZU사의 LC/MS-2020를 사용하였다.

Table I. Composition of the Mobile Phase Employed in the Gradient LC System

Time (min)	Composition of mobile phase (%)	
	0.1% TFA in Water	0.1% TFA in Acetonitrile
0	95	5
19	36	64
20	95	5
30	95	5

2. Alanine과 Leucine의 분석 조건

분석에 사용 한 Column은 Shim-pack XR-ODS (5 um, 4.6I.D.×150 mm, SHIMADZU) Column을 사용하였으며 temperature는 35°C, Injection Volume은 1 ul, Flow rate는 0.4 ml/min을 유지하였다. 이동상으로는 (A) 0.1% formic acid in water와, (B) 0.1% formic acid in acetonitrile을 초음파를 이용하여 degassing하여 사용하였고, gradient system을 이용하여 분석하였다(Table I). Detector는 Electrospray ionization - mass spectrometry (ESI-MS) 사용 하였으며 검출 조건은 Table II와 같다

3. 분석법 밸리데이션

분석법 밸리데이션은 한국식품의약품안전처의 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인’, ‘생약(한약)제제의 성분 프로파일 설정 가이드라인’ 및 ‘기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드’에 따라 특이성, 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성에 대한 평가를 실행하였다.

1) 특이성

특이성의 입증은 질량 분석기의 selected ion monitoring (SIM) mode를 이용하여 표준품의 특정 분자량만을 검출하여 분석 하였으며 scan mode를 통해 동일 retention time에서의 표준품과 한약조제용 자하거의 피크의 m/z 값을 비교하여 특이 분자량이 있는지를 확인하여 피크순도를 시험하였다.

Table II. Mass Detector Condition of Alanine and Leucine

Analytes	Condition
Interface	ESI(+)
Nebulizer gas flow	1.5
DL temperature (°C)	250
Heat block temp (°C)	400
Dry gas flow (L/min)	15
Selected ion monitoring (SIM) mode (m/z)	Alanine: 90, Leucine: 132

2) 직선성, 범위, LOD, LOQ

직선성, 범위, 검출한계(Limit of detection, LOD)와 정량한계(Limit of quantification, LOQ)는 5개의 농도(5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$)별로 3회 반복 시험을 하였다. 이를 이용하여, 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(x, $\mu\text{g/ml}$)와 피크 면적비(y)에 대한 검량선(calibration curve, $y=ax+b$)을 구하였다. 또한, 검량선으로부터 직선성의 상관계수(correlation coefficient, R^2)를 구하여 확인하여 상관계수(R^2)값이 0.995이상의 직선성을 가지는 구간을 범위로 설정하였다. LOD와 LOQ는 반응의 표준편차와 검량선의 기울기에 근거하여 계산하는 방법을 이용하였으며 공식은 아래와 같다

$$\text{LOD}=3.3 \times \sigma / S, \text{LOQ}=10 \times \sigma / S$$

σ : y 절편의 표준편차, S: 검량선의 기울기

3) 정밀성(Precision)

정밀성(Precision) 측정은 실험 환경의 변화에 따라 동일한 샘플에 대한 분석의 결과의 변화의 정도를 확인하기 위하여 상대 표준 편차(Relative Standard Deviation, RSD, %)로 통해 조사 하였다. 이는 반복성(Intra-assay precision) 검사는 3가지 농도를 설정을 하여 (62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$) 3회 반복 측정하였으며 ‘기능성원료 인정을 위한 제출자료 작성 가이드’를 참고하여 상대 표준 편차(RSD, %)가 5% 이상인 경우 측정날짜, 사람간, 기기간 등을 추가적으로 확인해야 하는 것을 기준으로 설정하여 평가하였다.

4) 정확성(Accuracy)

표준액 3가지 농도(62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$)를 각 3회 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차 정도(회수율, %)로서 정확성을 평가 하였다. 그 범위는 90%에서 110%사이를 이상적인 범위로 설정하여 평가하였다.

4. 자하거 약침의 분석

자생한방병원 남양주 원외당진원에서 조제 한 자하거 약침 3lot를 분석법 밸리데이션을 통하여 검증 된 분석법을 이용하여 자하거 약침의 지표성분 함량을 분석하였다.

결과»»»»

1. Alanine 분석법 검증

1) 특이성

ESI-MS의 Selected Ion Monitoring mode ($m/z=90$ [M+H]⁺)를 이용하여 Alanine 표준품을 분석 한 결과 4.45 분에서 peak를 얻었고, 한약조제용 자하거를 분석한 결과 이와 동일한 retention time을 가지는 peak를 얻을 수 있었으며 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인 하였다(Fig. 1A, B). 또한 scan mode를 통해 해당 peak들의 m/z 값을 비교하여 특이 분자량이 있는지를 확인한 결과 다른 특이 분자량이 없음을 확인 하였다(Fig. 2A, B).

2) 직선성, 범위, LOD, LOQ

지표물질을 5개의 농도(5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$)별로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 상관계수(R^2)를 계산해본 결과 5~500 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 상관계수가 0.999이상인 직선성을 확보 할 수 있었다(Fig. 3A). 그리고 얻어진 y 절편의 표준편차와 검량선의 기울기를 이용하여 LOD와 LOQ를 계산한 결과 각각 1.093 $\mu\text{g/ml}$ 와 3.311 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다(Table III).

3) 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

3개의 농도(62.5, 125, 250 $\mu\text{g/ml}$)로 3회 반복을 진행하여 정밀성과 정확성을 동시에 확인 하였으며, 회수율은 105.87%, RSD(%)는 농도 별로 각각 1.02, 1.59, 0.97로 측정되었다(Table IV).

2. Leucine 분석법 검증

1) 특이성

ESI-MS의 Selected Ion Monitoring mode ($m/z=132$ [M+H]⁺)를 이용하여 leucine 표준품을 분석한 결과 9.63 분에서 peak를 얻었고, 한약조제용 자하거를 분석한 결과 이와 동일한 retention time을 가지는 peak를 얻을 수 있었으며 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인 하였다(Fig. 1C, D). 또한 scan mode를 통해 해당 peak들의 m/z 값을 비교하여 특이 분자량이 있는지를 확인한 결과 다른 특이 분자량이 없음을 확인 하였다(Fig. 2C, D).

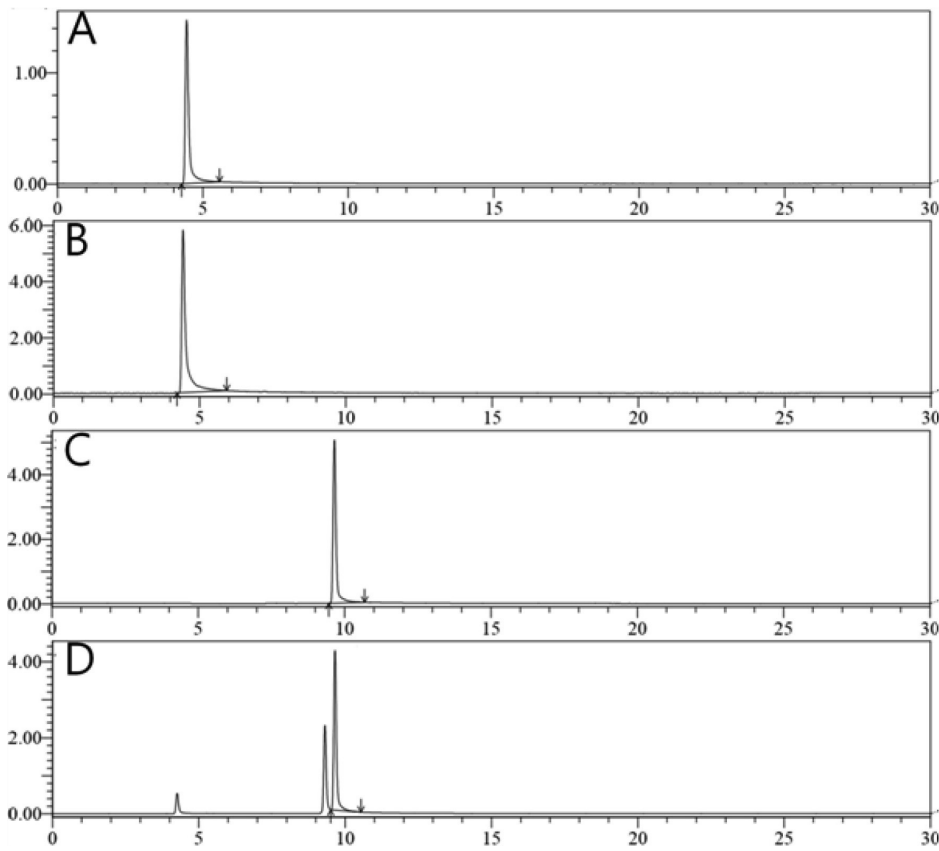


Fig. 1. LC/MS chromatogram of *Hominis-placenta* pharmacopuncture and standard compounds. (A) Alanine standard (SIM mode: m/z 90[M+H]⁺). (B) *Hominis-placenta* pharmacopuncture (SIM mode: m/z 90[M+H]⁺). (C) Leucine standard (SIM mode: m/z 132[M+H]⁺). (D) *Hominis-placenta* pharmacopuncture (SIM mode: m/z 132[M+H]⁺).

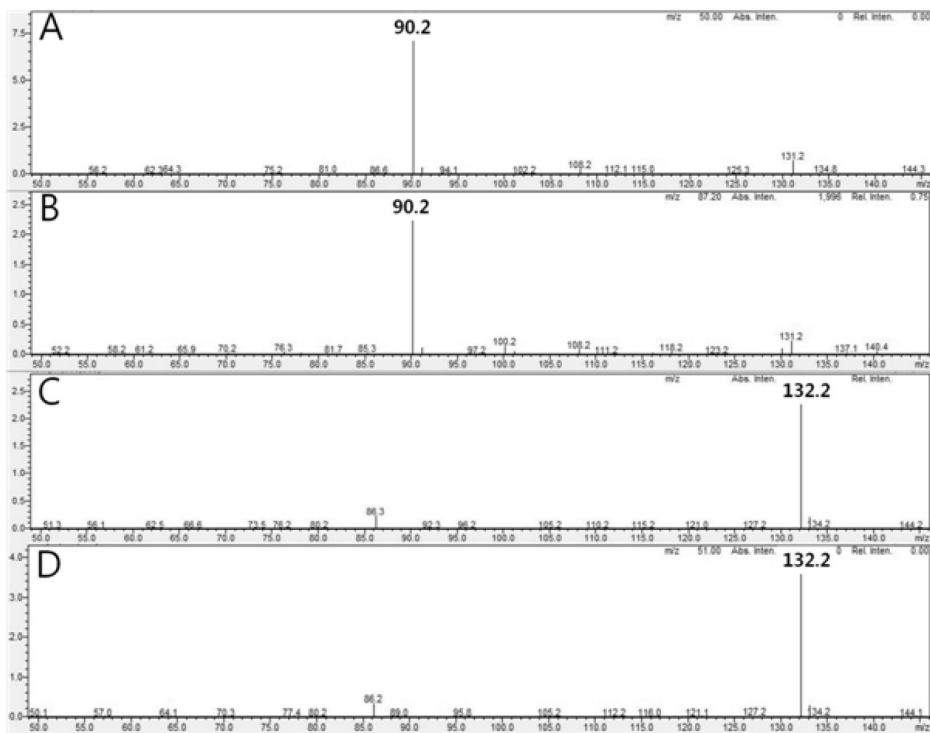


Fig. 2. Positive ESI-MS m/z spectrum of *Hominis-placenta* pharmacopuncture and standard compounds. (A) Alanine standard (retention time: 4.45, scan mode: m/z 50~145). (B) *Hominis-placenta* pharmacopuncture (retention time: 4.45, scan mode: m/z 50~145). (C) Leucine standard (retention time: 9.63, scan mode: m/z 50~145). (D) *Hominis-placenta* pharmacopuncture (retention time: 9.63, scan mode: m/z 50~145).

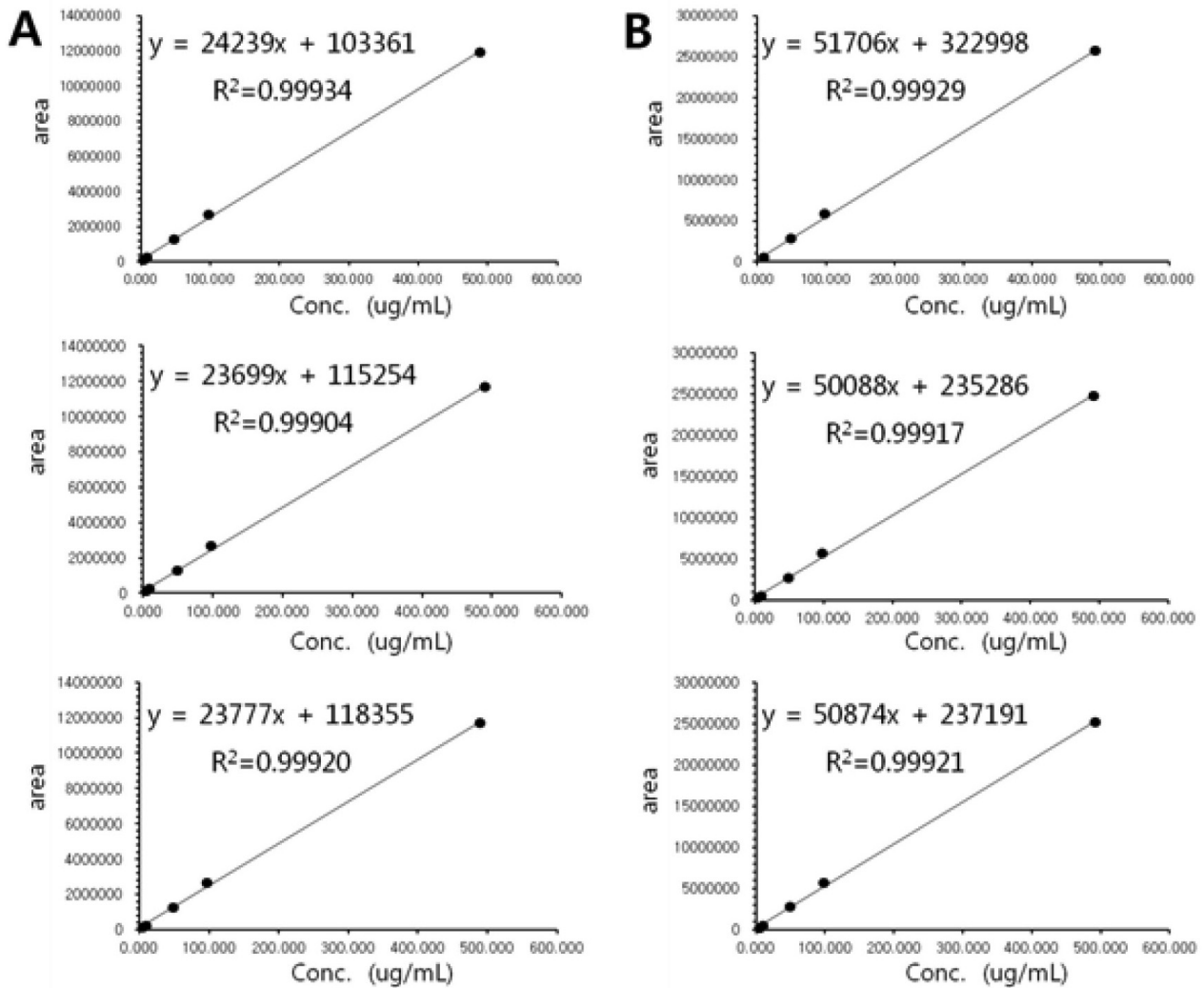


Fig. 3. Calibration curve of alanine and leucine. (A) Alanine calibration curve, (B) Leucine calibration curve.

Table III. The Linearity, Regression Equation, Correlation Coefficient(R^2), and LOD and LOQ for Measurement of Standard Components by LC/MS

Components	Regression equation*	R^2 (n=3)	LOD [†] ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ [‡] ($\mu\text{g/mL}$)
Alanine	$Y=23904.89x+112323.16$	0.99920	1.093	3.311
Leucine	$Y=50738.29x+325488.79$	0.99922	0.179	0.541

*Y: peak area, x: amount ($\mu\text{g/mL}$). [†]LOD (Limit of detection)= $3.3 \times (\text{SD of the response/slope of the calibration curve})$. [‡]LOQ (Limit of quantitation)= $10 \times (\text{SD of the response/slope of the calibration curve})$.

2) 직선성, 범위, LOD, LOQ

지표물질을 5개의 농도(5, 10, 50, 100, 500 $\mu\text{g/ml}$)별로 3회 반복 분석하여 검량선 및 직선성의 상관계수(R^2)를 계산해본 결과 5~500 $\mu\text{g/ml}$ 범위에서 상관계수가

0.999이상인 직선성을 확보 할 수 있었다(Fig. 3B). 그리고 얻어진 y절편의 표준편차와 검량선의 기울기를 이용하여 LOD와 LOQ를 계산한 결과 각각 0.179 $\mu\text{g/ml}$ 와 0.541 $\mu\text{g/ml}$ 로 확인되었다(Table III).

Table IV. Analytical Results of Accuracy Test for Standard Materials by LC/MS

Components	Spiked amount (μg/mL)	Measured amount (μg/mL, n=3)	RSD* (%)	Recovery [†] (%)
Alanine	62.5	64.13±0.65	1.02	105.87
	125	131.39±2.09	1.59	
	250	258.86±2.50	0.97	
Leucine	62.5	66.33±0.87	1.30	107.57
	125	136.53±2.70	1.98	
	250	256.31±3.53	1.38	

*RSD (%)=(SD/Mean)×100. [†]Recovery (%)=(amount found-original amount)/amount spiked×100%.

Table V. Content Analysis for *Hominis-placenta* Pharmacopuncture by LC/MS

	Alanine	Leucine
1 lot (n=3)	205.80±7.06	381.57±1.58
2 lot (n=3)	211.19±7.78	367.28±0.12
3 lot (n=3)	316.07±4.72	367.25±4.80
Average	211.02±7.28	372.03±7.58

3) 정밀성(Precision) 및 정확성(Accuracy)

3개의 농도(62.5, 125, 250 μg/mL)로 3회 반복을 진행하여 정밀성과 정확성을 동시에 확인하였으며, 회수율은 107.57%, RSD (%)는 농도 별로 각각 1.30, 1.98, 1.38로 측정되었다(Table IV).

3. 자하거 약침의 성분 분석

자생한방병원 남양주 원외당전원에서 조제한 자하거 약침 3lot를 각각 3회 반복 분석 한 결과 alanine은 211.02±7.28 ug/ml, luecine은 372.03±7.58 ug/ml 함유되어있음을 확인하였다(Table V).

고찰»»»»

자하거는 건강한 產母의 胎盤을 취합하여 혈관을 제거하고, 맑은 물에 반복적으로 세정한 후 건조시킨 것으로 人胞, 胞衣, 胎衣, 混沌衣, 混元母, 佛袈裟, 仙人衣 라고도 불린다⁸⁾.

동물의 placenta는 胎盤으로 통칭하여 왔으나, 동물의 placenta와 사람의 placenta를 구별하여 호칭하기 위해서 사람의 placenta는 자하거라고 별칭하여 부른다⁹⁾. 本草綱

目에서는 자하거의 효능에 대해 “血氣少瘦, 婦人勞損, 面黧皮黑, 腹內諸病, ……治男女一切虛損勞極, 癲癩失志恍惚” 이라하여 安心養血, 益氣補精의 효능으로 많이 사용되어 왔다¹⁰⁾. 東醫寶鑑에서는 자하거가 포함된 처방 및 자하거 단방의 효능과 주치에 대해서 설명한 부분들을 찾을 수가 있는데, 각각의 효능 및 주치를 살펴보면, 神門에서는 安心, 養血精神의 효능으로 癲癩, 健忘, 怔忡, 恐怖, 失志, 多言不定 등을 치료하는데 사용되었고, 蟲門에서는 勞嗽의 虛를 보하여 勞嗽을 치료하는데 사용되었다. 虛勞門에서는 滋陰補陽, 補陰 補眞氣의 효능으로 祭盤虛勞, 利水, 氣血衰弱, 房室過度, 五心煩熱, 咳嗽, 燥熱盜汗 등을 치료하는데 사용되었다¹¹⁾. 자하거에 함유된 성분에는 각종 세포 증가인자가 있는 것으로 알려져 있는데, 예를 들면, 간세포증식인자(HGF), 상피세포증식인자(EGF), 신경세포증식인자(NGF), 코로니 형성자극인자(CSF), 각종 인터루킨, 각종 인터페론, 글로불린 등이 있다. 또한 혈액응고인자와 각종 호르몬 및 그 전구체를 함유하고 있다. 이러한 예로는 성선자극호르몬, 프로락틴, 갑상선자극호르몬, 스테로이드 호르몬, 프로스타글란딘, 각종 효소, 인지질, 각종 다당류 등을 들 수 있다¹²⁾. 자하거 약침은 임상에서, 만성 간염, 간경변, 기관지천식, 폐결핵, 불임, 모유분비불량, 노화현상, 신경쇠약, 뇌졸중 등의 병증치료에 응용할 수 있다는 보고가 있다¹³⁾. 또한 자하거 약침은 여러 생쥐 실험을 통해 다양한 치료효과를 밝히고자 하는 노력이 이어져 오고 있다. 예를 들어, 외용도포를 통한 모발성장효과를 규명하였으며¹⁴⁾, 상처치유를 돕는다는 실험 결과도 있었다¹⁵⁾. 이 외에도 자하거 약침의 효과는 항산화 효소 활성 증진¹⁶⁾ 및 신장보호 기능¹⁷⁾, 관절염 치유 기능¹⁸⁾ 등이 실험을 통해 보고되었으며, 대식세포주의 유전자발현¹⁹⁾ 등에 대한 연구도 진행된 바가 있다.

재활의학 분야의 질환에 대한 활용에 있어서도 다양한

시도가 이어져왔고 극상근건염 및 삼각근하 점액낭염²⁰⁾, 복합부위통증증후군 환자의 건관절질환²¹⁾, 방아쇠수지²²⁾ 등에 적용한 보고가 있었다. 자하거 약침은 이와 같이 다양한 질환에 사용되고 있는데, 그 중 신경계 질환에 가장 높은 빈도로 보고되고 있다²³⁾.

자하거는 최근 인태반 주사제제로 양방에서도 활발히 시술되고 있는데, 간기능 개선제로 시판되고 있는 Laennec과, 갱년기 증상과 유즙분비 개선제로 사용되는 Melsmon이 그 대표적인 예라고 할 수 있다. 한국보건의료연구원에서 시행한 인태반 주사제제에 대한 체계적 고찰 연구의 결론은 인태반 주사의 유효성 및 안전성에 대한 근거가 아직 부족하다는 것이었다²⁴⁾.

양방적인 연구가 활발히 진행되면서 주사제제로 제품화가 이루어지는 가운데, 자하거 약침 제제 임상 연구에 대한 고찰은 부족한 상태였고, 그 표준화도 이루어져있지 않은 상태여서 관련 연구의 설계 및 시행시 방향 설정이 쉽지 않은 상태라고 볼 수 있다.

자하거는 대학약전 외 한약(생약)규격집에서 삭제된 이후, 원료의약품 신고대상 의약품으로 지정되었지만, 특별한 함량 기준 없이 총 질소함량을 제조업체의 자체 기준을 가지고 함량분석을 진행하고 있다. 하지만 총 질소함량 시험은 개별 성분에 대한 분석 방법이 아니기 때문에 자하거 약침의 품질 관리를 위하여 새로운 지표성분 설정이 필요한 현실이다. 이에 자하거 약침의 품질관리를 위한 지표물질의 선정과 지표물질에 맞는 분석법 개발 및 그 분석에 대한 검증 연구를 진행 하였다. 자하거는 인태반을 이용한 약제이므로 아미노산인 alanine과 luecine을 지표물질로 선정하고 LC/MS를 이용하여 한 번의 분석으로 두 가지 지표물질을 모두 검출할 수 있게 동시분석법을 개발하였다. 이렇게 개발한 분석법의 검증을 위하여 분석법 벨리데이션을 실시한 결과, 농도 범위 5~500 $\mu\text{g/ml}$ 사이에서의 직선성은 모두 상관계수가 0.999이상이었으며, 정량한계는 모두 5 $\mu\text{g/ml}$ 보다 낮아 정상적인 범위에서 분석이 이루어 졌음을 확인 할 수 있었다. 정밀성의 지표인 상대표준편차는 모두 5%이하였으며 정확성의 지표인 회수율은 90%에서 110%사이의 범위에 있어 정밀성 및 정확성이 높은 분석방법임을 확인 하였다.

이에 설정한 동시분석법을 이용하여 자하거 약침의 지표물질 함량을 분석한 결과 주변에 다른 peak와의 간섭이 없음을 확인하였으며, scan mode를 통해 해당 peak들

의 m/z 값을 비교하여 특이 분자량이 없음을 확인하였다.

자하거 약침 3lot를 각각 3회 반복 분석 한 결과 alanine은 211.02 ± 7.28 $\mu\text{g/ml}$, luecine은 372.03 ± 7.58 $\mu\text{g/ml}$ 함유하고 있어 지표물질로 사용 가능함을 확인 하였다.

본 연구가 자하거 약침의 표준화를 위한 기준을 설정하는데 도움을 줄 수 있을 것이라 판단하며, 이를 통해 재활의학 영역에서 다양한 연구 및 임상적 활용에 기여하고, 아울러 자하거 약침의 표준화를 넘어서 한약조제용 자하거를 이용한 다른 한약제제의 표준화에 일조할 수 있기를 기대한다.

결론»»»»

자하거는 인태반을 이용한 약제이므로 alanine과 luecine을 지표물질로 선정하였다. LC/MS를 이용하여 선정된 지표물질인 alanine과 luecine의 특이성, 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 정확성, 정밀성에 대한 평가를 실시한 결과 모두 양호한 결과를 보여 분석법에 문제는 없었으며, 자하거 약침의 성분 함량을 분석결과 alanine은 211.02 ± 7.28 $\mu\text{g/ml}$, luecine은 372.03 ± 7.58 $\mu\text{g/ml}$ 함유하여 지표물질로 손색이 없었다.

References»»»»

1. Shin, MK. Clinical Phytology. Seoul : Yeong-Rim-sa. 2002:191-2
2. Lee AR. A comparative study of general acupuncture therapy and Hominis Placenta pharmacopuncture therapy on severe dyspepsia. Dong-eui University Graduate School of Oriental medicine. 2013.
3. Jo TH, Park SS, Park KM. Efficacy of Human Placental Extract Pharmacopuncture into Kwanwon on Fatigue in Students. Journal of Korean Medicine. 2013;34(1): 29-34.
4. Jo NY, Kim JH, Roh JD. Clinical Review of the Effects of Hominis Placental Pharmacopuncture in the Treatment of Facial Spasm Patients. Journal of Pharmacopuncture. 2013;16(3):52-57.
5. Ron JH. The Effect of Hominis placenta pharmacopuncture on leg spasticity of stroke patients. Dong-eui University Graduate School of Oriental medicine. 2011.
6. Kim SP, Kim JH, Ryu HS, Cheon HS, Shin JC. The

- Clinical Report on 1 Case of Failed Back Surgery Syndrome Who were Diagnosed as the Cauda Equina Syndrome using Hominis Placenta Pharmacopuncture, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2011;28(5):135-142.
7. Notification No. 2005-54 of the Korea Food & Drug Administration
 8. Jung BM, Jin CS. Effects of Placenta Hominis on the Sex Hormon Content and Lipid Content in the Ovariectomized Rats, Korean Medicine Obstetrics and Gynecology, 2001; 14(1):103-117.
 9. Jang JB. A Study on Ja-Ha-guh, The Journal of Korean Medicine, 1965;2(5): 36-38.
 10. Li Shizhen. Compendium of Materia Medica(本草綱目), Seoul:Ui-seong-dang, 1993:2963-6.
 11. Oh CS, Lee H. The Study about Hominis Placenta in "Dong-Eui-Bo-Gam". Daejon University Institute of Oriental Medicine, 2007;6(1):31-40.
 12. Shim MG, Ahn DK, Kim CM, Lee GS. Encyclopedoa of chinese herbal medicine, Seoul:Jeongdam, 1998:4676
 13. Lee SK, The Study on the Hominis Placenta Aqua-acupuncture Solution, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2000;17(1):67-74.
 14. Jung JH. Investigation of the effect of topical Homonis Placenta pharmacopuncture solution on hair growth in C57BL/6 mice, Sangji University Graduate School of Oriental Medicine, 2013.
 15. Jung MS. Wound healing effects of Hominis placenta pharmacoacupuncture in diabetic mice, Kyunghee University Graduate School of Oriental Medicine, 2012.
 16. Lee JM. Effects of Hominis placenta pharmacopuncture on the blood picture and antioxidative activity in rats, Korean Journal of Acupuncture, 2009;26(2):53-60.
 17. Ryu JH, Choi DY, Kang SK. Renoprotective Effect of Hominis Placenta Aqua-acupuncture in Streptozotocin Induced Diabetic Rats, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2002;19(4):152-66
 18. Yeom MJ, Kang JE, Hahm DH, Park HJ, Lee EJ, Shim IS, Lee HJ. Therapeutic effects of Hominis placenta herb-acupuncture in adjuvant-induced arthritis rat, The Journal of Korean Institute of Pharmacopuncture, 2002;5(1):91-103.
 19. Jang HS, Lee KM, Lim SC, Yeom DM, Seo KC. Microarray Analysis of Gene Expression in Raw 264.7 Cells Treated with Hominis Placenta Herbal-Acupuncture Solution, Korean Journal of Oriental Medicine, 2006; 12(3):131-41.
 20. Kim MY, Choi YY, Choi HS, Jung YG, Choo WJ, Lee CR, Nam HW. The Clinical Observation of Oriental Medicine Treatment and Hominis placenta Pharmacopuncture in 4 Cases of Supraspinatus Tendinosis and Subdeltoid Bursitis, The journal of Korean Medicine of Information, 2011;17(2):1-15.
 21. Cho TH, Park KM. Effect of Placental Extract on Immobilization of Shoulder Joint in a Complex Regional Pain Syndrome Patient, The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society, 2012;29(4):93-97.
 22. Kim JW, Kim JY, Choi SB, Han SW, Lee JC, Kim DH. The Case Report of Trigger Finger Improved with Hominis Placenta Pharmacopuncture Treatment, The Journal of Korean Institute of Pharmacopuncture, 2010; 13(4):139-147.
 23. Lee JH, Cho DC, Moon SJ, Kong JC, Park TY, Ko YS, Song YS, Lee JH. Narrative Review of Clinical Trial on Hominis Placenta Pharmacopuncture in Korean Literature, The Korean Medicine Rehabilitation, 2012;22(3):79-88.
 24. National Evidence-based Healthcare Collaborating Agency. Medical technology assessment of Placenta injection on the availability and safety, 2009:7-117.