대한한의학회지 제32권 제5호(2011년 9월)
J Korean Oriental Med 2011;32(5):41-49

Original Article

평위산 전탕액의 보관온도 및 기간에 따른 주요성분 및 미생물 군집 변화

서창섭[1], 신현규[1], 김정훈[1] 신광수[2*]

[1]한국한의학연구원 한약EBM연구센터, [2]대전대학교 미생물생명공학과

Changes of Principal Components and Microbial Population in Pyungwi-san Decoction according to the Preservation Temperature and Period

Chang-Seob Seo[1], Hyeun-Kyoo Shin[1], Jung-Hoon Kim[1], Kwang-Soo Shin[2]

[1]Herbal Medicine EBM Research Center,
[2]Department of Microbiology & Biotechnology, Daejeon University

Objectives: To optimize the preservation method of herbal decoction, we investigated the content of principle components of Pyungwi-san, liquiritin, glycyrrhizin, and hesperidin according to preservation temperature and period. We also investigated the changing patterns of pH and microbial population in Pyungwi-san decoction as a model case.
Methods: With samples preserved at different temperatures, the content of liquiritin, glycyrrhizin, and hesperidin was determined using HPLC and microbial population was determined as viable counting method up to 8 times every month. Identification of isolated bacteria was performed by 16S rDNA analysis.
Results: The content of liquiritin and glycyrrhizin did not change according to the preservation temperature and period, but that of hesperidin was severely decreased at room temperature. The isolate from the decoction was identified as *Bacillus licheniformis* by 16S rDNA sequence analysis. Microbial population appeared after 3 months' preservation and reached maximum value at 4 months; at all tested temperatures, the pH showed the lowest value (4.4-4.5) simultaneously.
Conclusion: From the results, it seems to be that the microbial growth affects the pH of preserved decoction but not the change of liquiritin and glycyrrhizin content.

Key Words : 16S rDNA, Bacillus licheniformis, Pyungwi-san, preservation

서 론

한방의료기관에서 환자에게 10첩 혹은 20첩을 건조 한약재로 제공하든 시대에서, 1980년 대 후반에 개발되어 출시된 한약추출기는 당시로서는 획기적인 방법이었다[1)]. 탕전기를 통해 전탕한 한약 파우치는 복용의 편리성을 높여 한방 의료를 확산시키는데 크게 기여하였지만, 한약을 한꺼번에 달여 장기간에 걸쳐 복용할 경우 한약의 역가가 떨어지고 산도가 높아지는 등 여러 문제가 발생할 수 있다. 이러한 문제점에도 불구하고 전탕 파우치는 치료 효과와 복용의 편리성 때문에 현재 널리 사용하고 있는 방법

・Received : 3 August 2011 ・Revised : 2 September 2011 ・Accepted : 7 September 2011
・Correspondence to : 신광수(Kwang-Soo Shin)
대전광역시 동구 용운동 96-3 대전대학교 자연과학대학 미생물생명공학과
Tel : +82-42-280-2439, Fax : +82-42-280-2608, E-mail : shinks@dju.kr

이다[2]. 따라서 현재 한의계에서는 탕전기에서 추출한 전탕 파우치의 보관조건 및 보관기간을 최적화하기 위한 과학적인 지침을 필요로 하고 있다.

그 동안 한약 전탕액의 보관 유통에 대한 사전 연구를 살펴보면, 한약 처방 전탕액의 경시적 변화에 대한 활성 효과를 관찰한 유효성 연구[3-8]와 손[9] 등의 감초, 지실, 인진 탕전액에 대한 보관 조건과 기간에 대한 안정성 연구가 있다. 이들 연구들은 한약의 약효에 영향을 주는 유효성과 안정성을 목적으로, 전탕액의 항균, 항염, 진통, 항부종 효과 실험과 지표성분의 변화를 관찰하였다.

본 연구에서는 한약 전탕액의 약효 및 성분의 변화를 줄 수 있는 또 다른 인자인 자체 미생물의 변화에 대해서 연구하였다. 대표적인 소화기 질환 처방으로, 구성 한약재 수가 적고, 한의원 사용 빈도 8위인 평위산[10] 전탕액을 대상으로 보관 온도 및 보관 기간에 따른 평위산 탕액의 주요 지표성분, 산도 및 미생물 군집의 변화를 측정하고, 이를 바탕으로 전탕액의 보관 방법 및 유통기한에 대한 기초자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용된 평위산의 구성 원료 한약재인 진피(Citri Unshius Pericarpium), 생강(Zingiberis Rhizoma) 및 대조(Zizyphi Fructus)는 (주)옴니허브(Yeongcheon, Korea)에서 구입하였으며, 창출(Atractylodis Rhizoma), 후박 (Magnoliae Cortex) 및 감초(Glycyrrhizae Radix)는 (주)HMAX(Chungbuk, Korea)에서 각각 구입하였다.

2. 시약 및 기기

표준물질인 liquiritin과 glycyrrhizin은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan)로부터 구입하였으며, 각 표준물질의 순도는 98% 이상이었다. HPLC 분석을 위한 methanol, acetonitrile 및 water는 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였으며, acetic acid는 특급시약으로 Junsei(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

함량분석을 위한 HPLC는 LC-20A 시스템(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)을 사용하였고, 시스템은 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 처리하였다. pH는 692 pH/Ion meter (Metrohm, Switzerland)를 사용하여 측정하였다.

3. 추출물 조제 및 보관

평위산 전탕액은 평위산 3제 분량 (1.575 kg)을 약재 무게의 10배수에 해당하는 약 15 L의 증류수로 105℃에서 2시간 증기를 배출하지 않은 가압식 방법으로 전탕하였다. 평위산 1첩의 함량은 Table 1과 같으며, 전탕액 팩을 상온 (25℃), 냉장 (4℃) 및 냉동(-20℃)에 보관하면서 1개월 간격으로 꺼내어

Table 1. Composition of Pyungwi-san

Korean Name	Common Name	Scientific Name	Content (g)
창출 (蒼朮)	Atractylodis Rhizoma	*Atractylodes japonica*	7.50
진피 (陳皮)	Citri Unshius Pericarpium	*Citrus unshi*	5.25
감초 (甘草)	Glycyrrhizae Radix	*Glycyrrhizia uralensis*	2.25
후박 (厚朴)	Magnoliae Cortex	*Magnolia officinalis*	3.75
생강 (生姜)	Zingiberis Rhizoma	*Zingiber officinale*	3.75
대조 (大棗)	Zizyphi Fructus	*Zizyphus zizyphus*	3.75

분석하였다. 대조군으로는 조제한 직후의 전탕액 팩을 사용하였다.

4. 함량분석

1) 검량선 작성 및 검액 조제

보존용액은 liquiritin, hesperidin 및 glycyrrhizin의 표준품의 무게를 정확하게 측정한 후 methanol을 넣어 모두 1,000ug/mL의 농도로 조제한 후 4℃에 보관하였다. Liquiritin의 검량선은 1.17-300.00ug/mL, hesperidin은 1.95-500.00ug/mL 및 glycyrrhizin은 3.13-500.00ug/mL의 범위에서 검량선을 작성하였다. 검액은 조제된 평위산 전탕액을 0.2 um syringe filter (SmartPor, Woongki Science, Seoul. Korea)로 여과하여 검액으로 하였다.

2) HPLC 분석조건

평위산 내 주요성분인 liquiritin, hesperidin 및 glycyrrhizin의 함량을 분석하기 위하여 Shimadzu사의 LC-20A 시스템(Kyoto, Japan)을 사용하여 측정하였다. 분석에 사용 된 칼럼은 SunFire C18(5um, 4.6×250 mm, Waters Co., Milfore, MA, USA) 칼럼을 사용하였고, 칼럼온도는 40℃로 유지하였다. 유속은 1.0mL/min으로 흘려주었으며 주입량은 10uL였다. 이동상은 1.0% acetic acid가 함유된 water(A)와 1.0% acetic acid가 함유된 acetonitrile(B)을 사용하여 A/B=85/15(0min), A/B=35/65(35min), A/B=0A/100B(45min, hold for 5 min), A/B=85/15(55min)의 기울기용매 조건으로 흘려주었으며, 검출파장은 254nm와 280nm에서 검출하였다.

5. 미생물 계수

미생물 군집 측정은 세균의 경우 시료 1mL씩을 멸균 후 45℃로 식힌 15mL의 카제인 대두 소화 한천배지(casein soybean digest agar)를 넣어 잘 혼합한 후 페트리접시에 부어 30-35℃에서 5일간 배양하여 평판당 300개 이하의 세균 집락을 최대치로 하여 세균 수를 측정하였다. 진균의 군집은 세균의 경우와 동일하나 배지 1L당 50mg의 클로람페니콜이 첨가된 사부로 포도당 한천배지(sabouraud dextrose agar)를 사용하여 배양온도 20-25℃에서 7-10일간 배양한 후 100개 이하의 세균 집락이 나타나는 평판을 세어 총 진균수를 측정하였다.

6. 세균의 분리 및 동정

배지에서 자라나는 세균 군집을 선택하여 그람염색을 행하여 세균의 형태적 특징과 그람반응을 관찰하였다. 동시에 PCR 방법을 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하여 최종 동정을 하였다.

1) 16SrDNA 유전자의 증폭

진정세균 영역(Eubacteria domain)에 속하는 세균 16SrDNA의 공통적인 서열을 인지하는 프라이머인 27F(5'-AGAGTTTGATCMTGGCTC AG-3')와 1492R (5'-GGYTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 반응용액은 3차 증류수 33.5uL, 10X PCR 완충용액 5uL, dNTP(2.5mM) 4uL, 각 프라이머 2uL(10pM), Taq DNA polymerase(5unit/uL) 0.5uL 및 주형 DNA 3uL 순으로 최종 부피가 50uL가 되도록 제조하였다. 반응조건은 94℃에서 10분간 pre-heating한 후 94℃에서 1분 30초, 45℃에서 1분, 72℃에서 2분의 조건으로 30 cycle 증폭한 후 72℃에서 8분간 최종 extension하였다. 반응액을 1.0% agarose gel에서 전기영동하여 1.5kb의 크기에 해당하는 DNA band 유무를 확인하였다.

2) PCR 산물의 정제 및 염기서열 분석

PCR 산물을 1.0% agarose gel에서 전기영동 한 후 DNA purification kit를 사용하여 정제한 후, 솔젠트사에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 16S rDNA의 염기서열을 BLAST(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAS T)를 이용하여 GenBank에 있는 염기서열과 상동성을 비교 분석하였다. 계통수 작성은 Clustal X(version 1.81) 프로그램으로 multiple sequence alignment한 후, neighbor-joining method

를 이용하여 계통분류학적 유연관계를 추론하였으며, Bootstrap 값은 1,000회로 하였다.

결 과

1. 평위산 중 hesperidin, liquiritin 및 glycyrrhizin의 함량

평위산의 구성 약재 중 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin, 진피의 주요성분인 hesperidin의 표준물질을 대상으로 HPLC를 수행한 결과, retention time이 각각 11.4분(liquiritin), 13.8분(hesperidin) 및 31.8분(glycyrrhizin)으로 나타났다 (Fig. 1A and 1B). 본 실험에서 제조한 평위산 탕액 시료를 동일한 조건으로 분석한 결과, 표준물질의 retention time에서 peak가 나타나 liquiritin, glycyrrhizin 및 hesperidin이 존재함을 알 수 있었다(Fig. 1C and 1D). Liquiritin, glycyrrhizin 및 hesperidin의 양과 peak 면적에 대한 상관관계는 상관계수(r^2)가 0.9999 이상인 정상

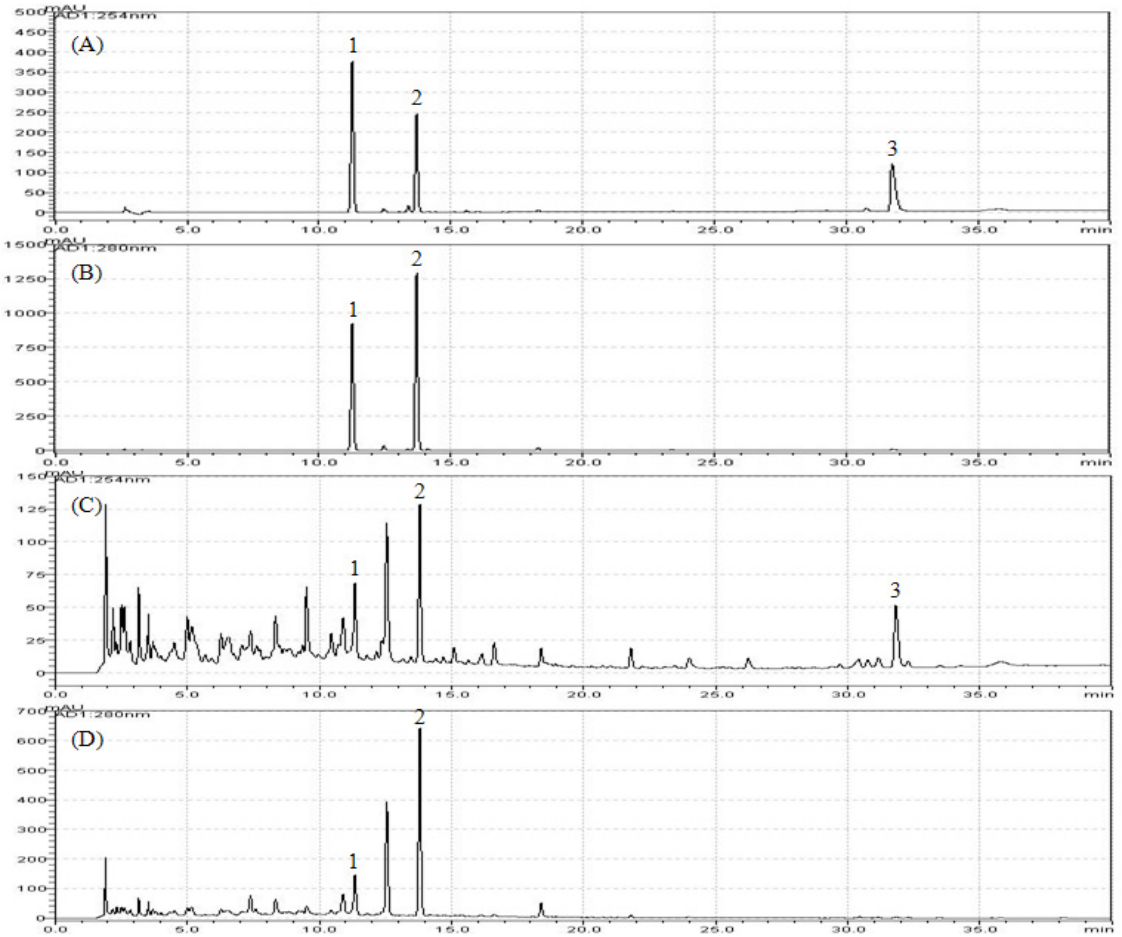

Fig. 1. HPLC chromatogram of the standard mixture of 3 compounds with detection at 254nm(A) and 280nm(B). Pyungwi-san sample at 254nm(C) and 280nm(D). under optimized HPLC conditions. Column: SunFire C18 column, 4.6×250㎜, 5um; mobile phase: 1.0%(v/v) acetic acid in water(A) and 1.0%(v/v) acetic acid in acetonitrile (B); gradient: 0 min: 85A/15B, 35 min: 35A/65B, 45min: 100B, 50min: 100B; flow rate: 1.0mL/min; inject volume: 10uL; temperature: 40℃; detection: 254nm and 280nm. Liquiritin(1), hesperidin(2), and glycyrrhizin(3)

관이었으며, 이를 이용한 지표 성분에 대한 분석결과 평위산 탕액에는 liquiritin이 0.57~0.66mg/g, glycyrrhizin 이 0.67~0.82 mg/g, hesperidin이 1.35~2.7mg/g 함유되어 있었다. 보관기간 및 보관온도에 따른 지표 물질의 함량변화를 살펴본 결과, liquiritin은 보관방법 및 기간에 따라 성분 함량이 큰 변화를 보이지 않았으며, glycyrrhizin은 상온에서 보관하였을 경우 오차 범위 내에서 함량이 증가하는 것으로 나타났다. 그러나 hesperidin은 냉동 보관에서는 함량의 변화가 거의 없는 반면에 냉장 보관에서는 함량이 약 18% 정도 감소되었으며, 상온 보관에서는 함량이 약 38% 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

2. 세균의 분리 동정 및 계통학적 분석

본 실험에서 제조한 10개의 탕액을 무작위로 선택하여 조산한 결과, 진균은 전혀 검출되지 않았으며, 순수 분리된 세균은 1종 (strain OM21)으로 그람양성이었으며, 간균(bacillus)이었다. 확인된 간균을 PCR 방법을 사용하여 16S rDNA 유전자를 증폭한 후 염기서열을 분석하여 세균을 동정한 결과, 예측한 바와 같이 Bacillus licheniformis의 16S rDNA 유전자염기서열과 98% 유사도 (1086/1098 bp)를 보였으며, 이를 근거로 분리된 세균을 *B. licheniformis*로 동정하였다(Fig. 3).

3. 보관에 따른 세균 군집의 변화

상온, 냉장 온도 및 냉동 온도에서 보관 중인 한 약 탕액 팩을 일정시간 간격으로 꺼내어 탕액의 산도와 미생물 군집을 조사하였다. 최초 탕액의 산도는 pH 5.0 정도였으나 보관 시기에 따라 점차 산도가 감소하여 4개월 후에 모든 보관 온도에서 pH 4.4-4.5로 급격하게 감소하였으며, 그 후 점차 증가하여 최종적으로는 상온보관 탕액은 pH 4.7, 냉동 및 냉장보관 탕액은 pH 4.9-5.0으로 나타났다(Fig. 4). 미생물 군집의 변화는 냉동 온도에서 보관한 시료의 경우 초기에는 미생물 군집이 검출한계 이하

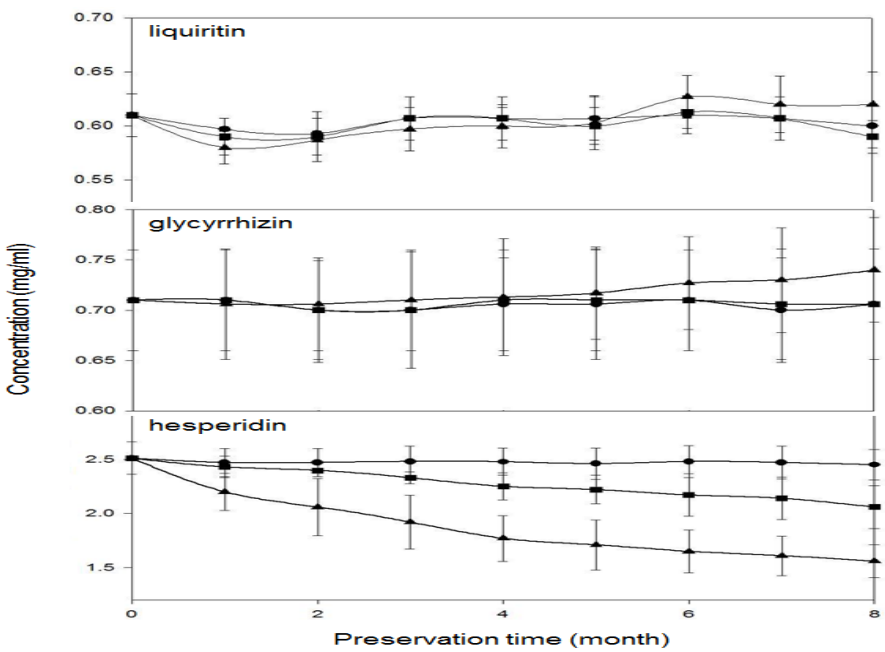

Fig. 2. Change of liquiritin (upper), glycyrrhizin (middle), and hesperidin (lower) content according to the preservation time. The preservation temperature was room temperature (▲), 4 ℃ (■), and -20 ℃ (●), respectively.

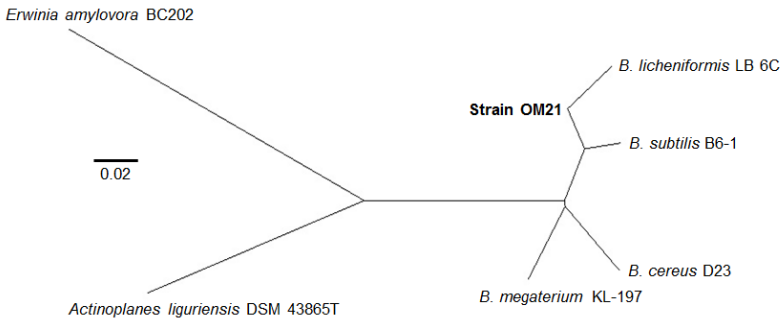

Fig. 3. Neighbour-joining tree based on 16S rDNA sequences showing relationships between strain OM21 and some related species. Strain OM21 was closely related to B. licheniformis and B. subtilis. Scale bar indicates 0.02 nucleotide substitution per nucleotide position.

였으나 보관한지 3개월 된 시료에서 1mL 당 23.17 CFU가 관찰되었으며, 4개월 후 최대치인 25.16 CFU가 나타난 후 5개월 째 3.8CFU로 급격하게 군집 수가 감소하였다. 냉장 온도와 상온의 경우도 유사한 양상을 보였으며 군집 수는 4개월 후 각각 17.3 및 43.0CFU/mL로 상온에서 보관한 시료에서 가장 많은 군집이 나타났으며, 6개월 이후에는 세균이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 4).

고 찰

한약은 의약품으로 보관 방법, 유통 기한 등의 기본적인 의약품 정보를 명시하고, 환자에게 복약지도를 시행하여야하나, 한방의료기관에서 제조 전탕된 한약 추출액은 이러한 요건을 갖추기가 어려운 현실이 있다. 따라서 전탕 팩이란 형태를 통해 한약을 제공한지 20여년이 지났지만, 한약 전탕액에 대한

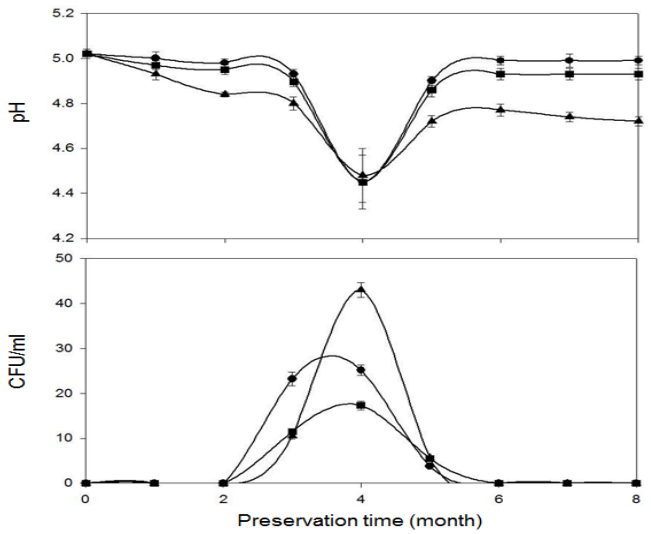

Fig. 4. Change of microbial population and pH according to the preservation time. The preservation temperature was room temperature (▲), 4 ℃ (■), and -20 ℃ (●), respectively. Microbial population was reached maximum at 4 month in all tested temperature, the pH showed the lowest value simultaneously.

보관 조건이나 기간에 대한 지침이 없다. 이러한 연구를 위해서는 전탕액의 안정성과 유효성을 검정하는 것이 기본이나 전탕액이 한방 의료기관 내에서 전탕되고, 이러한 전탕시설과 공간이 무균상태도 아니므로 미생물에 대한 오염 또한 중요한 인자라고 볼 수 있다. 따라서 본 연구에서는 한약의 최적 보관 방법과 기간을 알아보고자 평위산을 선정하여 8개월 동안 보관에 따른 주요성분 및 미생물 군집의 변화를 조사하였다.

평위산의 주요성분의 분석 결과, 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin은 보관방법 및 기간에 따라 성분 함량이 큰 변화를 보이지 않았으나 진피의 주요성분인 hesperidin은 냉장 보관에서는 함량이 약 18%, 상온 보관에서는 약 38% 감소하였다. 이는 손[9] 등이 감초, 지실, 인진의 지표성분을 8주 동안 관찰한 결과, glycyrrhizin이 상온과 냉장에서 함량이 각각 10% 및 23.5%가 감소하였으며, poncirin의 경우 상온에서 6.7%, 냉장에서 16%가 감소하였으며, 6,7-Dimethoxycoumarin은 실온에서 0.3%, 냉장에서 9.1% 감소하는 것으로 보고하였다. 이러한 지표성분의 함량 변화를 통한 한약 추출액의 안정성 기준이 없어 전탕액의 보관 기간을 정하기에는 어려움이 있어 계속적인 연구와 학계의 논의가 필요하다고 본다.

평위산의 주요성분 분석과 함께 실시한 미생물 실험에 있어서는 먼저 전탕하기 위한 구성 한약재 자체가 이미 미생물에 오염이 될 수 있다. 건조된 한약재는 가열공정 이외에는 특별한 멸균과정이 없어 열에 강한 미생물의 생존이 불가피하며 육진약(六陳藥)의 경우 호기성 총 세균의 오염율이 17.7%, 총 진균의 오염율이 41.2%로 보고되었다[11]. 또한 60℃ 이상의 고온에서 제조하는 한약 탕액에도 고온내성 세균인 *B. meaterium, B. subtilis, B. cereus, B. circulans, Paenibacillus rhizpspharae* 등과 같은 Bacillus 속의 미생물들이 존재한다는 보고가 되어 있다[12]. 제조된 한방 탕액내에 존재하는 미생물의 생장 정도는 보관 기간, 보관 온도 등의 환경에 따라 크게 달라지며, 이들의 증식에 의해 한약의 부패나 변질이 우려되고 한약의 품질저하 등 심각한 문제를 유발할 수 있다[13]. 이러한 이유로 현재 국내에서는 식품의약품안전청 고시 제 2009-101호[14]에 의해 생약(한약) 추출물 세균의 오염한도를 10^5CFU/mL 이하로 제한하고 있으며, 진균은 10^2CFU/mL이하로 제한하고 있다. 따라서 평위산 탕액으로부터 분리된 미생물은 주로 토양과 조류의 깃털에서 발견되는 세균으로 계통학적으로는 *B. subtilis* 및 *B. pumilus*와 유연관계가 높다. 주로 여러 가지 식품, 특히 유제품에 많이 오염되어 식품의 부패를 일으키며 위장에 감염하여 식중독을 일으키는 병원균으로 알려져 있는 *Bacillus licheniformis*로 동정되었다[15]. 따라서 *B. licheniformis*가 검출 제한 세균의 범주에 속하지는 않지만 한약 탕액의 철저한 멸균 및 관리를 통해 반드시 제거해야 할 것으로 판단된다. 이러한 미생물의 군집은 4개월째 최대치를 보였으며, 이 시기에 탕액의 pH도 4.4-4.5로 감소한 것으로 미루어보아 보관 중에 일련의 미생물 대사가 일어났음을 추정할 수 있으며, 이는 세균에 의한 발효의 결과로 여러 가지 유기산이 생성되고 이러한 유기산의 영향으로 탕액 내의 산도가 감소한 것으로 추정되며, 차후 유기산의 존재 유무 및 종류, 함량에 대한 연구가 필요할 것으로 판단된다.

전탕액의 유효기간에 대한 사전 연구를 살펴보면, 금[3] 등은 대황목단피탕의 경시적인 효능변화로 항부종실험 항균실험을 통해 9일 이상 보존은 피해야 한다고 했으며, 한[4] 등은 소시호탕 전탕액으로 흰쥐의 혈청 GOT, GPT, ALP, LDH 활성도를 관찰하여 보관이 10일 이하가 타당하다고 하였으며, 길[5] 등은 연교패독산의 생쥐 소염 및 항균효과에서 9일을 넘어서는 안된다고 하였으며, 최[6] 등은 영선제통음 전탕액의 진통 소염실험을 통해 9일, 김[7] 등은 인진호탕 전탕액으로 흰쥐의 혈청 GOT, GPT, ALP, LDH 활성도를 관찰하여 보관이 10일 이하, 윤[8] 등은 작약감초탕 전탕 액의 흰쥐 진통 및 항경련 효과를 관찰한바 10일 이상 보존은 지양한다고 하였다. 따라서 이들 처방 전탕액의 보관 시한은 9일이나 10일 이하를 제시하고 있다. 그러나, 서[16] 등은 HPLC를

이용하여 평위산 전탕팩의 glycyrrhizin 함량 변화를 측정하여 유통기한을 상온 41개월, 냉장 24개월 및 냉동 34개월로 보고하였으며, 손[9] 등은 HPTLC를 통해 감초, 지실, 인진 3종류의 한약물 탕전액을 실온과 냉장 저장 상태에서 8주 동안 성분 변화를 연구하여 특이한 성분소실이나 새로운 성분의 변화가 없으므로 8주의 유통기간을 제시하였다.

따라서, 한약 전탕액의 유통기간을 서[16] 등의 장기보존 시험에 따른 결과는 24개월 이하, 손[9] 등의 지표성분 연구 결과는 8주를 제시하였으나, 동물을 이용한 유효성 실험에서는 10일 이하를 제시하고 있어 보관기간에 너무나 다양한 결과를 볼 수 있다. 따라서 향 후 보관 방법 및 기간별 약효실험연구가 한약 전탕액의 보관 유통기간을 정하는데 중요한 연구라고 사료된다.

결 론

한약의 최적 보관 방법과 기간을 알아보고자 평위산 탕액의 보관에 따른 지표 성분 및 미생물 군집의 변화를 조사하였다. 8개월 동안 평위산 탕액의 주요성분의 변화에서는 감초의 주요성분인 liquiritin과 glycyrrhizin의 성분 함량은 큰 변화를 보이지 않았으나, 진피의 주요성분인 hesperidin은 냉장 보관에서는 함량이 약 18%, 상온 보관에서는 약 38% 감소한 것으로 나타났다. 미생물 군집 변화의 경우 4개월째 상온에서 43.0CFU/mL, 냉장에서 43.0CFU/mL 및 냉동에서 25.16CFU/mL의 최대치로 나타났으나, 이는 식품의약품안전청 허가 기준인 10^5CFU/mL 이하 (세균) 및 10^2CFU/mL 이하(진균)보다 현저히 낮은 수치로 나타났다. 본 연구 결과 주요성분의 변화량과 미생물 군집의 변화와는 상관관계를 찾아 볼 수 없었으며, 향후 다양한 조건과 더불어 세포 및 동물 실험에 대한 효능 연구가 한약 전탕 파우치의 보관 방법과 기간 설정에 중요한 요소라고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 한국한의학연구원에서 지원하는 '표준 한방처방EBM구축사업(K11030)'에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 김호철. "한약파우치는 오래 보관하면 효과가 감소한다." 한의신문. 2010.08.27.
2. 이재민. 창간19주년 기념특집-한의원 한약문화 ①. 민족의학신문. 2008.07.18.
3. Keum HK, Lee SI. A study on the effect changes of Dae Hwang Mo Nan Pi Tang due to the time elapse. Kor. J. Herbology 1991;5(1):83-98
4. Han KS, Chio YB, Lee YJ. A study on the degraded effect of decocted Sosihotang over a period. Kor. J. Herbology 1998;13(2):7-12.
5. Kil GJ, Lim DB, Lee YJ. A study on the degraded effect of decocted Yeonkyopaedogsan over a period. Kor. J. Herbology 1998;13(1):173-86.
6. Choi YB, Lim DB, Lee YJ. A study on the degraded effect of decocted Youngsunjetongeum over a period. Korean J. Orient. Med. 1998; 19 (1):410-8.
7. Kim WG, Choi YB, Lee YJ. A study on the degraded effect of decocted Injinhotang over a period. Kor. J. Herbology 1998;13(2):14-8.
8. Yun SJ, Lee SI. Study of Jagyakgamchotang's effect change by time. Kor. J. Herbology 1992; 6(1):29-34.
9. Son JY, Shin JW, Son CG. Stability study for herbal drug according to storage conditions and periods. J Korean Oriental Med. 2009;30(2): 127-32.
10. Lee JT. Research on intake of Chinese medicine by Korean. Seoul:Korea Food and Drug Administration. 2006:1-244.
11. Lee JH, Jeon WK, Ko BS, Chun JM, Lee AY,

Kim HK. A montoring for the establishment of microbial limit of herbal medicine (I). Korean J. Orient. Med. 2006;12: 49-57.

12. Yu YB, Ma JY, Ha HK, Huang DS, Kim BK, Shin KS, et al. Observation of microorganism in herbal decoction manufactured by Korean medical clinic. The Kor. J. Oriental Medical Pres. 2007; 15:119-26.
13. Choi SM, Chung HJ, Yoon YS, Lee MY, Choi HS, Sung HJ. Studies on the administration of the quality of herbal medicine. J. Korean Oriental Med. 2000;21:99-112.
14. Korea Food and Drug Administration. A notice from 2009-101. Seoul:Korea Food and Drug Administration. 2009.
15. Salkinoja-Salonen MS, Vuorio R, Andersson MA, Kämpfer P, Andersson MC, Gonkanen-Buzalski T, et al. Toxigenic strains of Bacillus licheniformis related to food poisoning. Appl. Environ. Microbiol. 1999;65:4637-45.
16. Seo CS, Kim JH, Lim SH, Shin HK. Estimation of shelf-life by long-term storage test of Pyungwi-san. Korean J Orintal Medical Prescription. 2011; 19(1):183-94.