

목단피 추출물의 Oxypaeoniflorin 및 Paeoniflorin의 분석법 개선 및 검증

최승현^{1*} · 유창길^{2*} · 황지현³ · 이기쁨³ · 이영진² · 이부용³ · 이옥환¹

¹강원대학교 식품생명공학과
²차의과학대학교 통합의학대학원
³차의과학대학교 식품생명공학과

Modification and Validation of Analytical Method for Oxypaeoniflorin and Paeoniflorin in Moutan Cortex Radicis Extract

Seung-Hyun Choi^{1*}, Chang-Kil Yoo^{2*}, Ji-Hyun Hwang³, Gi-Bbeum Lee³,
Young-Jin Lee², Boo-Yong Lee³, and Ok-Hwan Lee¹

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University

²Graduate School of Integrative Medicine and ³Department of Food Science and Biotechnology, CHA University

ABSTRACT The aim of this study was the validation of a modified analytical method for determination of oxypaeoniflorin and paeoniflorin in Moutan Cortex Radicis extract. For validation of the analytical method, we modified established analytical methods and validated improvement. For validation, the specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification of oxypaeoniflorin and paeoniflorin were measured by high performance liquid chromatography. The results show that the correlation coefficients of the calibration curve for oxypaeoniflorin and paeoniflorin were 1.0000 and 0.9998, respectively. The LOD for oxypaeoniflorin and paeoniflorin were 0.23 µg/mL and 0.25 µg/mL, respectively. The inter-day and intra-day precision values of oxypaeoniflorin and paeoniflorin were 0.70~3.19% and 1.74~2.43%, and 0.32~0.92% and 0.62~2.28%, respectively. The inter-day and intra-day accuracies of oxypaeoniflorin and paeoniflorin were 98.33~102.11% and 97.72~118.12%, and 98.44~101.56% and 97.10~112.00%, respectively. Therefore, the analytical method was validated for the detection of oxypaeoniflorin and paeoniflorin in Moutan Cortex Radicis.

Key words: Moutan Cortex Radicis, oxypaeoniflorin, paeoniflorin, HPLC-PDA, method validation

서 론

목단피(Moutan Cortex Radicis)는 작약과 목단(모란, *Paeonia suffruticosa* Andrews)의 뿌리껍질로서 한방에서 예로부터 해열, 양혈, 구어, 진통 및 항균 등의 효능을 가지고 있어 널리 사용되고 있다(1-6).

목단피의 생리활성으로는 동맥경화 억제, 관절염, 항염증, 혈소판 응집억제, 폐혈증 억제, 항산화 및 tyrosinase 억제효과, 히스타민 유리억제, TNF- α 생성저해, 항당뇨효과 등의 생리활성이 보고되고 있다(7-13). 이런 목단피의 주요 성분으로는 paeonol, paeonoside 등의 페놀류, oxypaeoniflorin, paeoniflorin 등의 monoterpene 배당체, tetragalloyglucose 등의 탄닌류 등을 함유한 것으로 알려져

있다(14-16). 이 중 oxypaeoniflorin과 paeoniflorin은 hyaluronidase 억제효과(17) 등의 생리활성을 가지고 있는 것으로 보고되었다.

최근 건강식품에 대한 소비자의 관심 및 니즈가 증가하고 있고 다양한 소재로 제품이 개발되고 있으며, 목단피의 경우 다양한 생리활성 효능이 알려져 있기 때문에 목단피 추출물을 이용하여 개별인정형 건강기능식품 개발 시 원료의 표준화를 위한 유용성분에 대한 검출방법 및 분석법 검증에 대한 연구가 필요하다. 건강기능식품을 개발하기 위해서는 기능성 및 안전성을 과학적으로 입증해야 하며 기능성 원료에 대한 표준화가 필요하다(18). 표준화란 원재료의 생산부터 제조 과정 전반에 사용된 기술 및 정보를 관리함으로써 천연 물질에 함유된 고유 성분의 변동을 최소화시켜 품질을 일정하게 유지하는 것을 말하며, 표준화의 일반적인 지표로는 지표성분을 이용한다. 지표성분의 확인을 통하여 기능성 원료의 기능성이 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있으므로 이를 확인하기 위하여 공인된 분석방법 또는 정밀한 분석방법을 사용하여야 하며, 기준 규격을 설정하기 위해 분석방법의 타당성 및 신뢰성이 검증되어야 한다(19). 현재 high-

Received 22 June 2017; Accepted 26 July 2017

Corresponding author: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea

E-mail: loh99@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-6454

*These authors contributed equally to this work.

performance liquid chromatography-photodiode array (HPLC-PDA), high-performance liquid chromatography-mass spectrometry(HPLC-MS) 등을 이용한 목단피 중 유용성분들의 분석법이 일부 보고되어 있으나(20-25), 유효성 검증(method validation)이 시행되지 않아 분석법의 타당성 및 신뢰성을 확보하기 힘든 실정이다.

따라서 본 연구에서는 목단피 추출물의 건강기능식품 원료로 개발 시 원료의 표준화를 위하여 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 분석법 개발 및 검증에 대한 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 목단피(Moutan Cortex Radicis)는 중국 안휘성에서 6년 이상 재배된 목단의 뿌리를 채취하였으며, 잔뿌리와 목심부를 제거하고 껍질 부분만 무황처리한 뒤 이를 건조시켜 사용하였다. 표준물질 oxypaeoniflorin과 paeoniflorin은 MedChem Express Co.(Monmouth Junction, NJ, USA)에서 구입하였다. 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)와 formic acid는 Junsei Chemical(Tokyo, Japan)에서 구입하였으며 acetonitrile은 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 분석

목단피에 함유된 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 분석을 위한 시료는 다음과 같이 제조하였다. 채취된 목단피를 1차 선별을 통하여 줄기 및 흙을 제거한 후 세척하고 1차 건조를 진행하였다. 이를 거심작업을 거치고 일정크기로 절단을 한 후 2차 건조를 거치고 입고검사를 진행한 다음 2차 선별을 통하여 이물질 및 가루를 제거하였다. 이렇게 선별한 목단피 시료 500 g을 깨끗하게 세척한 후 5단계 정수 필터로 정수된 물 8,000 mL에 3시간 탕전하여 추출물을 제조하였다. 제조된 목단피 추출물의 추출 수율은 $12.27 \pm 0.15\%$ 로 확인되었다. 조추출물을 filter paper(Whatman No. 3, Whatman, Maidstone, UK)를 이용하여 여과한 후에 회전식 진공 농축기(Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축한 다음, 동결건조기(Ilshin BioBase Co., Ltd., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 동결건조물로 제조하여 실험에 사용하였다. Oxypaeoniflorin과 paeoniflorin의 HPLC 분석은 Xu 등(22)의 분석방법을 변형하여 최적 분석방법을 확립한 후 실시하였으며, 두 개의 표준물질을 동시분석 하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector(Waters Co., Milford, MA, USA)로 조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Capcell pak C₁₈ MG(4.6 mm×250 mm, 5.0 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였다.

Table 1. HPLC conditions of oxypaeoniflorin and paeoniflorin analysis for Moutan Cortex Radicis extract

Instrument	Conditions		
Column	Capcell pak C ₁₈ MG (5.0 μm, 4.6 mm×250 mm)		
Column temp.	25°C		
	Time (min)	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)
	0	95	5
Mobile phase (gradient)	2	95	5
	30	84	16
	31	95	5
	35	95	5
Detector	Waters 996 Photodiode Array Detector (254 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	35 min		

¹⁾0.1% formic acid in water.

²⁾0.1% formic acid in acetonitrile.

표준용액 및 시험용액의 조제

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 표준물질을 각각 10 mg을 취한 후 10 mL 정용플라스크를 이용하여 1,000 μg/mL의 농도가 되도록 DMSO로 표준까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 stock solution을 이용하여 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL가 되도록 DMSO로 희석하여 사용하였다. 시험용액은 동결건조된 시료 50 mg을 칭량한 후 50 mL 정용플라스크를 이용하여 1,000 μg/mL의 농도가 되도록 DMSO로 표준까지 채운 다음, 이를 0.45 μm syringe filter(Whatman)로 여과하여 시험용액으로 하였다.

분석법의 유효성 검증

분석법의 유효성 검증은 International Conference for Harmonization(ICH) 가이드라인(26)을 근거로 하여 개발된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ)를 이용하여 분석법의 유효성을 검증하였다.

특이성

표준물질 oxypaeoniflorin, paeoniflorin 및 목단피 추출물을 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin이 선택적으로 분리가 되는지 확인하였으며 PDA spectrum을 확인하여 동일한 spectrum을 나타내는지 확인하였다.

직선성

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 표준물질을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 제조하여 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정하였으며, 각 표준물질의

peak에 대한 면적과 농도비의 관계를 표시하는 검량선을 작성하고 작성한 검량선으로부터 얻어진 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통하여 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 목단피 추출물에 표준용액 oxypaeoniflorin과 paeoniflorin을 6.25, 25, 100 µg/mL의 농도를 각각 첨가하여 일내(intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위하여 하루에 3회 반복하여 HPLC로 분석하였으며, 일간(inter-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위하여 3일간 반복하여 HPLC로 분석하였다. 분석하여 얻어진 peak의 머무름 시간(retention time, RT)과 PDA spectrum을 비교하여 정성을 하고 작성한 검량선에 시험용액의 peak 면적을 대입하여 oxypaeoniflorin과 paeoniflorin의 농도를 계산하였다. 각 결과값의 표준편차를 결과값의 평균으로 나눈 비인상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 일내 및 일간 정밀성을 확인하였으며, 정확성은 다음 식을 이용하여 첨가한 농도에 대비하여 회수된 농도를 계산함으로써 회수율을 구해 정확성을 확인하였다.

$$\% \text{ recovery} = \frac{(C_f - C_u)}{C_a} \times 100$$

C_f : Concentration of spiked sample
 C_u : Concentration of sample
 C_a : Concentration of standard

검출한계 및 정량한계

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 검출한계 및 정량한계는 검량선의 기울기와 반응의 표준편차에 근거하는 방법을 사용하였으며 다음식을 이용하여 확인하였다.

$$LOD = \frac{3.3\sigma}{S}$$

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

σ : The standard deviation of the response
 S : The slope of the calibration curve

결과 및 고찰

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 크로마토그램

목단피의 두 성분을 동시에 분석할 수 있는 동시분석 조건이 요구된다. 기존의 보고된 분석법(22)을 재현한 결과 분석시간이 길고 반복 측정 시 압력의 안정화 시간이 짧아 기기의 안정화가 제대로 이루어지지 않아 재현성이 낮은 문제점을 보였다. 따라서 기기조건을 일부 변경하여 최적 분석조건을 확립하였다(Table 1). HPLC를 이용하여 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 표준물질을 분석하였을 때 oxypaeoniflorin은 259 nm에서 최대흡수파장을 나타내었으며, paeoniflorin은 233 nm에서 최대흡수파장을 나타내었

다(Fig. 1). 각 물질의 최대흡수파장인 259, 233 nm 및 기존 보고된 논문의 분석 파장인 254 nm에 따른 두 물질의 peak 면적을 비교하여 최적 면적값을 나타내는 파장 값을 확인한 결과, 254 nm에서 두 물질의 최적 peak 면적값을 나타내어 최적분석파장은 254 nm로 설정하였다. He 등(24)에 의하면 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin을 254 nm에서 분석하였다고 보고하였으며, 이와 유사한 경향을 나타내었다.

특이성 확인

특이성은 추출물, 불순물 등이 혼합되어 있는 시료에서 분석대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 능력을 말한다. 표준용액과 목단피 추출물의 chromatogram을 비교하여 oxypaeoniflorin과 paeoniflorin peak를 확인한 결과 Fig. 2와 같이 다른 성분의 간섭 없이 선택적으로 분리되었음을 확인하였다. 또한, 목단피 추출물을 분석하였을 때 표준용액의 머무름 시간과 추출물의 두 물질의 머무름 시간이 일치한 것을 확인하였으며, 표준용액과 목단피 추출물의 PDA spectrum 결과에서도 동일한 spectrum을 나타내었으며 이를 통하여 본 시험법의 특이성을 확인하였다(Fig. 1).

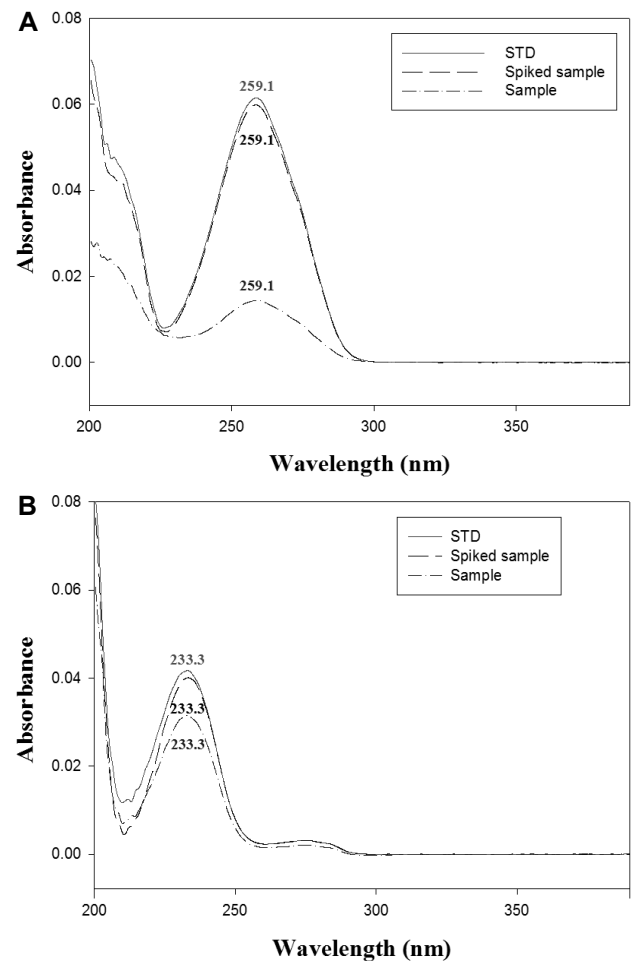


Fig. 1. PDA spectrums of oxypaeoniflorin (A) and paeoniflorin (B) in STD, spiked sample, and Moutan Cortex Radicis extract.

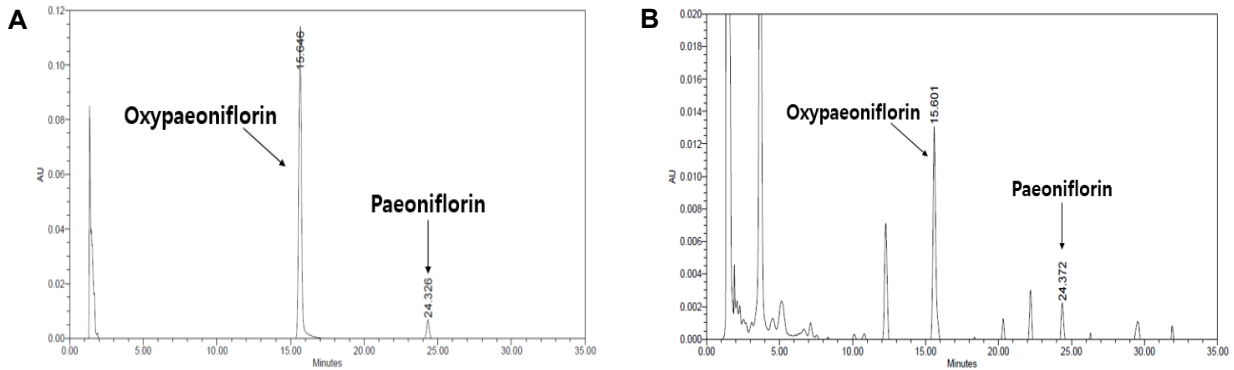


Fig. 2. HPLC chromatograms of oxypaeoniflorin and paeoniflorin. Standard (A), Moutan Cortex Radicis extract (B).

검량선을 이용한 직선성 확인

Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 표준용액을 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 µg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과, 표준검량선이 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 각각 $y=30953x-7337$, $y=2456x-1113$ 으로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 oxypaeoniflorin 1.0000, paeoniflorin 0.9998로 나타나 우수한 직선성을 보였다(Fig. 3).

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 목단피 추출물에 표준용액을 각각 저농도(6.25 µg/mL), 중간농도(25 µg/mL), 고농도(100 µg/mL)로 첨가한 뒤 HPLC로 분석하여 분석하였을 때, 각 측정 결과 값 사이의 근접성을 확인하여 정밀성을 평가하였고, 회수율을 측정하여 정확성을 평가하였다. 정밀성의 결과는 상대 표준편차(RSD)로 확인하였다. Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 정밀성은 Table 2와 같이 일간 정밀성에서 각각

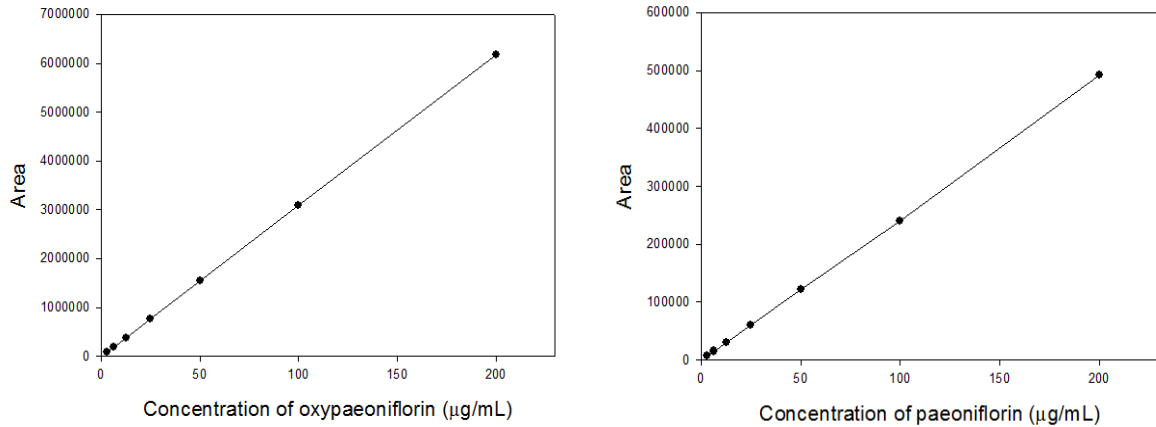


Fig. 3. Calibration curve of oxypaeoniflorin and paeoniflorin standard solution.

Table 2. Precision and accuracy of oxypaeoniflorin and paeoniflorin analysis for Moutan Cortex Radicis extract

Analytes	Concentration (ppm)	Mean±SD (ppm)	RSD (%)	Recovery (%)	
Oxypaeoniflorin	Intra-day	6.25	6.31±0.06 ¹⁾	0.92	100.92
		25.0	24.61±0.23	0.92	98.44
		100.0	101.56±0.32	0.32	101.56
	Inter-day	6.25	6.24±0.20	3.19	99.91
		25.0	24.58±0.17	0.70	98.33
		100.0	102.11±0.81	0.80	102.11
Paeoniflorin	Intra-day	6.25	7.00±0.16	2.28	112.00
		25.0	24.51±0.15	0.62	98.03
		100.0	97.10±1.55	1.60	97.10
	Inter-day	6.25	7.38±0.18	2.43	118.12
		25.0	57.7±0.4	2.10	97.98
		100.0	113.4±0.5	1.74	97.72

¹⁾Value are mean±SD in triplicate (n=3).

Table 3. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of oxypaeoniflorin and paeoniflorin analysis for Moutan Cortex Radicis extract

Analytes	Range (µg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R ²)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
Oxypaeoniflorin	3.13~200	30952.58	-7336.88	1.0000	0.23	0.71
Paeoniflorin	3.13~200	2455.50	-1112.61	0.9998	0.25	0.77

Table 4. Content of oxypaeoniflorin and paeoniflorin in Moutan Cortex Radicis extract

Sample	Compounds (mg/dry weight g)	
	Oxypaeoniflorin	Paeoniflorin
Moutan Cortex Radicis extract	6.43±0.20 ¹⁾	20.25±0.37

¹⁾Value are mean±SD in triplicate (n=3).

0.70~3.19%, 1.74~2.43%를 나타내었으며 일내 정밀성에서는 0.32~0.92%, 0.62~2.28%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타내었다.

정확성은 회수율을 측정하여 나타내었다. Table 2와 같이 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 일간 정확성은 98.33~102.11%, 97.72~118.12%를 나타내었으며, 일내 정확성은 98.44~101.56%, 97.10~112.00%로 우수한 정확성을 나타내었다.

검출한계 및 정량한계

검출한계와 정량한계는 ICH 가이드라인에 근거하여 분석한 결과 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 검출한계는 각각 0.23 µg/mL, 0.25 µg/mL로 측정되었고, 정량한계는 각각 0.71 µg/mL, 0.77 µg/mL로 나타났다(Table 3). 이상의 결과를 볼 때 목단피의 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin은 HPLC를 이용하여 동시분석이 가능하며 정량분석이 가능한 것으로 나타났다.

목단피 추출물의 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin 함량 분석

확립된 분석법을 이용하여 목단피 추출물 내 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 함량 분석 결과는 Table 4와 같이 oxypaeoniflorin 6.43±0.20 mg/dry weight g, paeoniflorin 20.25±0.37 mg/dry weight g의 함량을 가지고 있는 것으로 분석되었다.

요 약

목단피의 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 함량 분석 및 원료의 표준화를 위하여 분석법의 개발 및 검증을 실시하였다. 기존의 보고된 분석법을 개선하여 분석법을 개발하고 확립된 분석법에 대한 분석법 검증을 실시하였다. 분석법 검증은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 통하여 분석법의 신뢰성을 검증하였다. HPLC를 이용한 분석방법에서 표준용액의 머무름 시간과 목단피 추출물

의 머무름 시간이 일치하였으며, 동일한 spectrum을 나타내는 것을 확인하여 분석법의 특이성을 검증하였다. Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 검량선은 상관계수 값이 각각 1.0000, 0.9998로 나타나 우수한 직선성을 보여주어 분석에 적합함을 확인하였다. 농도를 아는 시료에 인위적으로 저농도, 중간농도, 고농도의 표준물질을 첨가하여 정밀성 및 정확성을 계산하였다. Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 정밀성은 일간 정밀성, 일내 정밀성으로 확인하였으며, oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 일간 정밀성은 각각 0.70~3.19%, 1.74~2.43% 수준으로 확인되었으며, 일내 정밀성은 0.32~0.92%, 0.62~2.28% 수준으로 5% 이하의 우수한 정밀성을 보였다. 정확성 측정 결과 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 일간 정확성은 98.33~102.11%, 97.72~118.12%를 나타내었으며, 일내 정확성은 98.44~101.56%, 97.10~112.00% 수준으로 우수한 정확성을 나타내었다. Oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 검출한계는 각각 0.23 µg/mL, 0.25 µg/mL였고 정량한계는 0.71 µg/mL, 0.77 µg/mL로 나타내어, 저농도에서도 검출이 가능함을 확인하였다. 분석법 검증 결과, 확립된 분석법은 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계가 모두 우수한 분석법임을 검증하였다. 또한, 검증된 분석법을 이용하여 목단피 추출물 시료 중 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 함량을 분석한 결과 oxypaeoniflorin 6.43±0.20 mg/dry weight g, paeoniflorin 20.25±0.37 mg/dry weight g의 함량을 가지고 있는 것으로 확인되었다. 본 연구 결과 목단피의 지표성분인 oxypaeoniflorin 및 paeoniflorin의 HPLC를 이용한 동시분석방법이 적합한 분석방법임이 검증되었다.

REFERENCES

- Bae KH. 2000. *The medicinal plants of Korea*. Kyo-Hak Publishing Co., Ltd., Seoul, Korea. p 364.
- Kwon OG, Kim SH, Chun BY, Park CK, Son KH. 1999. Isolation of antimicrobial components from Moutan cortex. *Korean J Pharmacogn* 30: 340-344.
- Kubo M, Matsuda H, Tani T, Arichi S, Kitagawa I. 1984. Studies on Moutan Cortex (VII): Inhibitory effects on histamine release from rat peritoneal mast cells *in vitro*. *Shoyakugaku Zasshi* 38: 276-278.
- Yook CS, Lee SJ, Yoo SJ, Kim TH, Han YG, Lee SY, Moon YH, Han MW, Lee GS. 1981. *Korean herbal medicine*. Gyechuk Publishing Company, Seoul, Korea. p 184.
- Herbal Medicine School Compilation Committee. 2012. *Pharmacognosy*. Dongmyeong Publishing Company, Seoul, Korea. p 523-525.

6. Choi YJ. 1991. *Growing and using wild edible greens*. Osung Publishing Co., Seoul, Korea. p 252-259.
7. Wang B, Pang Z, Zhang Q. 1994. Chemiluminescence in the study of paeonol. *Chung Kuo Yao Hsueh Tsa Chih* 29: 35-38.
8. Dai M, Zhi X, Peng D, Liu Q. 1999. Inhibitory effect of paeonol on experimental atherosclerosis in quails. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 24: 488-490.
9. Lin HC, Ding HY, Ko FN, Teng CM, Wu YC. 1999. Aggregation inhibitory activity of minor acetophenones from *Paeonia* species. *Planta Med* 65: 595-599.
10. Li G, Seo CS, Lee KS, Kim HJ, Chang HW, Jung JS, Song DK, Son JK. 2004. Protective constituents against sepsis in mice from the root cortex of *Paeonia suffruticosa*. *Arch Pharmacol Res* 27: 1123-1126.
11. Kim SH, Kim SA, Park MK, Kim SH, Park YD, Na HJ, Kim HM, Shin MK, Ahn KS. 2004. Paeonol inhibits anaphylactic reaction by regulating histamine and TNF- α . *Int Immunopharmacol* 4: 279-287.
12. You JK, Chung MJ, Kim DJ, Seo DJ, Park JH, Kim TW, Choe M. 2009. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Paeonia suffruticosa* water extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 292-296.
13. Park S, Jun DW, Park CH, Jang JS, Park SK, Ko BS, Kim BJ, Choi SB. 2004. Hypoglycemic effects of crude extracts of *Moutan Radicis Cortex*. *Korean J Food Sci Technol* 36: 472-477.
14. Li Q. 1988. Advances in the pharmacology of the root bark of *Paeonia suffruticosa*. *Zhong Cao Yao* 19: 276-278.
15. Rho S, Chung HS, Kang M, Lee E, Cho C, Kim H, Park S, Kim HY, Hong M, Shin M, Bae H. 2005. Inhibition of production of reactive oxygen species and gene expression profile by treatment of ethanol extract of Moutan Cortex Radicis in oxidative stressed PC12 cells. *Biol Pharm Bull* 28: 661-666.
16. Hsu FL, Lai CW, Cheng JT. 1997. Antihyperglycemic effects of paeoniflorin and 8-debenzoylpaeoniflorin, glucosides from the root of *Paeonia lactiflora*. *Planta Med* 63: 323-325.
17. Jeong SJ, Ahn NH, Kim YC. 1998. Hyaluronidase inhibitors from Moutan Cortex Radicis. *Korean J Pharmacogn* 29: 44-47.
18. Kim YH, Bae DB, Park SO, Lee SJ, Cho OH, Lee OH. 2013. Method validation for the determination of eleutherosides and β -glucan in *Acanthopanax koreanum*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1419-1425.
19. KFDA. 2008. *Guideline for standard of health functional food*. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. p 1-146.
20. Fujiwara H, Tabuchi M, Yamaguchi T, Iwasaki K, Furukawa K, Sekiguchi K, Ikarashi Y, Kudo Y, Higuchi M, Saido TC, Maeda S, Takashima A, Hara M, Yaegashi N, Kase Y, Arai H. 2009. A traditional medicinal herb *Paeonia suffruticosa* and its active constituent 1,2,3,4,6-penta-*O*-galloyl- β -D-glucopyranose have potent anti-aggregation effects on Alzheimer's amyloid β proteins *in vitro* and *in vivo*. *J Neurochem* 109: 1648-1657.
21. Kim HG, Park G, Piao Y, Kang MS, Pak YK, Hong SP, Oh MS. 2014. Effects of the root bark of *Paeonia suffruticosa* on mitochondria-mediated neuroprotection in an MPTP-induced model of Parkinson's disease. *Food Chem Toxicol* 65: 293-300.
22. Xu SJ, Yang L, Zeng X, Zhang M, Wang ZT. 2006. Characterization of compounds in the Chinese herbal drug Mu-Dan-Pi by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 20: 3275-3288.
23. Deng XM, Yu JY, Ding MJ, Zhao M, Xue XY, Che CT, Wang SM, Zhao B, Meng J. 2016. Liquid chromatography-diode array detector-electrospray mass spectrometry and principal components analyses of raw and processed Moutan Cortex. *Pharmacogn Mag* 12: 50-56.
24. He C, Peng B, Dan Y, Peng Y, Xiao P. 2014. Chemical taxonomy of tree peony species from China based on root cortex metabolic fingerprinting. *Phytochemistry* 107: 69-79.
25. Xiao C, Wu M, Chen Y, Zhang Y, Zhao X, Zheng X. 2015. Revealing metabolomic variations in Cortex Moutan from different root parts using HPLC-MS method. *Phytochem Anal* 26: 86-93.
26. ICH Harmonised Tripartite Guideline. 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Geneva, Switzerland. p 1-13.