pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 35, No. 6, pp. 544~551 (2020)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2020.35.6.544

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

황백의 지표성분 berberine과 palmatine의 분석법 개발과 검증 및 항산화 효능 평가

장길웅[1] · 최선일[1] · 한웅호[1] · 문효[1] · 권희연[1] · 최예은[1] · 박병우[2] · 김정진[2] · 이옥환[1]*
[1]강원대학교 식품생명공학과, [2](주)콤비메드

Development and Validation of Analytical Method and Antioxidant Effect for Berberine and Palmatine in *P.amurense*

Gill-Woong Jang[1], Sun-Il Choi[1], Xionggao Han[1], Xiao Men[1], Hee-Yeon Kwon[1], Ye-Eun Choi[1], Byung-Woo Park[2], Jeong-Jin Kim[2], Ok-Hwan Lee[1]*
[1]*Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, Korea*
[2]*CombiMed Co. Ltd. Yanggu, Korea*

(Received October 30, 2020/Revised November 17, 2020/Accepted November 18, 2020)

ABSTRACT - The aim of this study was to develop and validate a simultaneous analytical method for berberine and palmatine, which are representative substances of *Phellodendron amurense*, and to evaluate the antioxidant activity. We evaluated the specificity, linearity, precision, accuracy, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ) of analytical methods for berberine and palmatine using high-performance liquid chromatography. Our result showed that the correlation coefficients of the calibration curve for berberine and palmatine exhibited 0.9999. The LODs for berberine and palmatine were 0.32 to 0.35 μg/mL and the LOQs were 0.97 to 1.06 μg/mL, respectively. The inter-day and intra-day precision values for berberine and palmatine were from 0.12 to 1.93 and 0.19 to 2.89%, respectively. The inter-day and intra-day accuracies were 98.43-101.45% and 92.39-100.60%, respectively. In addition, the simultaneous analytical method was validated for the detection of berberine and palmatine. Moreover, we conducted FRAP and $NaNO_2$ scavenging activity assays to measure the antioxidant activities of berberine and palmatine, and both showed antioxidant activity. These results suggest that *P.amurense* could be a potential natural resource for antioxidant activity and that the efficacy can be confirmed by investigating the content of the berberine and palmatine.

Key words : *Phellodendron amurense*, Berberine, Palmatine, Method validation, Antioxidant activity

산업화된 국가에서 아토피 환자는 지속적으로 증가하는 추세로 국내에서는 유채원생의 34%, 초등학생의 25% 정도가 아토피 피부염의 증세를 보이고 있다[1)]. 이러한 아토피성 피부염의 증상은 염증성 피부질환으로 특정 알레르겐에 대한 알레르기 반응이 특징적이다[2)]. 그러나, 이와 같은 만성적인 피부질환의 치료 목적으로 스테로이드와 같은 약물의 사용함으로 인해 많은 부작용이 나타나고 있어 피부질환 증상완화 목적의 치료제로 유효성과 안정성이 확보된 지속적인 사용이 가능한 제품의 개발이 절실한 상황이다[3)]. 이에 따라, 피부개선에 사용될 수 있는 한방 천연소재를 이용한 많은 연구가 시도되고 있다. 그러므로 본 연구에서는 염증성 피부질환에 효능이 있는 것으로 알려진 한방 천연소재 중 황백(*Phellodendri cortex*)에 대하여 연구를 진행하였다.

황백은 운향과(*rutaceae*) 식물인 황벽나무(*Phellodendron amurense Ruprecht*)의 껍질을 벗겨내 말린 줄기껍질이다[4)]. 황백은 신라시대부터 사용된 전통 한약재로 해독, 해열, 황달, 설사, 염증, 폐렴, 감기 등에 유용한 생약으로 폭넓게 사용되고 있다[5)]. 황백의 항균작용, 항바이러스작용, 항

*Correspondence to: Ok-Hwan Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea
Tel: +82-33-250-6454, Fax: +82-33-259-5561
E-mail: loh99@kangwon.ac.kr

Copyright © The Korean Society of Food Hygiene and Safety. All rights reserved. The Journal of Food Hygiene and Safety is an Open-Access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution,and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

염증작용, 항고지혈작용 등의 약리활성 및 다양한 기능성은 isoquinoline alkaloid의 protoberberine class인 berberine, palmatine 등의 alkaloids에 의한 것으로 알려져 있다[6-8]. 황백의 가장 대표적인 지표물질인 berberine은 황백 내에 0.6~2.5% 정도가 함유되어 있는 것으로 알려져 있으며, 항염증, 전염증성 cytokine 생성 억제, 항균작용, 암세포 생장 억제 등의 연구가 진행된 바가 있다[9-13]. 또 다른 지표물질인 palmatine은 멜라닌 생합성 억제, 모노아민 산화효소 저해활성, 고혈당 저해 등이 보고되었다[14,15]. 이와 같이 berberine과 palmatine에 관한 약리학적 효능 및 생리활성 연구에 관한 연구가 꾸준히 진행된 바가 있으나, 항산화 활성에 관한 연구는 비교적 많이 진행되지 않았고 이를 적용한 연구도 부족한 실정이다. 또한 최근 한방 소재에 대한 관심과 수요가 증가함에 따라 한방 소재의 보다 체계적이고 효율적인 품질 관리법의 확립이 요구되고 있다[16].

황백에서 berberine을 정량 분석하기 위한 고속액체크로마토그래프(High performance liquid chromatograph, HPLC) 분석방법은 보고된 바 있으나 다른 alkaloid 성분들과의 동시분석방법은 부족한 실정으로 이는 구성 성분들 간의 시너지 효과 및 복잡성을 밝히기에 불충분하며 편향된 평가로 이어질 수 있다[17].

따라서 본 연구에서는 황백의 대표적인 지표물질인 berberine과 palmatine의 동시분석법의 개발 및 검증을 진행하고 항산화 활성에 대해 연구하였다.

Materials and Methods

실험재료

본 실험에서 사용된 황백 추출물은 콤비메드(Yanggu, Korea)에서 제공받아 사용하였다. Berberine, phosphoric acid, potassium ferricyanide, trichloroacetic acid, Iron(III) chloride, sodium acetate, sodium phosphate, TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine), ferric chloride, acetic acid, griess reagent 등은 Sigma (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MI, USA)로부터 구입하여 사용했으며, palmatine은 PhytoLab (PhytoLab GmbH & Co., Vestenbergsgreuth, Germany)로부터 구입하여 사용하였다. 용매로 사용한 acetonitrile은 J.T. Baker (J.T.Baker Chemicals Co., Phillipsburg, NJ, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

Berberine 및 palmatine 분석

Berberin과 palmatine의 HPLC 분석은 Li 등[17]의 분석방법을 변형하여 실시했으며, 두 개의 표준물질을 동시 분석하였다. 분석에 사용한 기기는 Waters 2695 Separation Module HPLC system과 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters, Milford, MA, USA)로 분석조건은 Table 1과 같으며 분석용 column은 Intersil ODS-3 C_{18} (4.6 mm × 250 mm, 5.0 μm, Intersil, Milpitas, CA, USA)이었다.

Table 1. HPLC conditions of berberine and palmatine analysis

Instrument	Conditions		
Column	Intersil ODS-3 C_{18} (4.6 mm x 250 mm, 5.0 μm, Intersil)		
Column temp.	25°C		
Mobile phase (Gradient)	Time (min)	A[1]	B[2]
	0	88	12
	10	85	15
	18	78	22
	24	76	24
	30	72	28
	35	72	28
Detector	Water 996 Photodiode Array Detector (334 nm)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	10 μL		
Run time	40 min		

[1]0.1% Phosphoric acid.
[2]Acetonitrile.

표준용액 조제

Berberine 및 palmatine 표준물질을 각각 10 mg 취한 뒤, 10 mL 정용플라스크를 이용해 1,000 μg/mL의 농도가 되도록 증류수로 표선까지 정용하여 이를 stock solution으로 하였다. Working solution은 제조된 berberine 및 palmatine stock solution을 각각 5 mL씩 섞어 500 μg/mL의 standard mixture를 제조하고 이를 증류수로 희석하여 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL이 되도록 하였다.

분석법의 유효성 검증

분석법의 유효성 검증(method validation)은 ICH (International Conference for Harmonization) 가이드라인[18]을 근거로 하여 개발된 분석법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정밀성(precision), 정확성(accuracy), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantification, LOQ)를 이용하여 분석법의 유효성을 검증하였다.

특이성

표준물질 berberine, palmatine을 HPLC로 분석하여 얻은 chromatogram을 비교하여 berberine과 palmatine이 선택적으로 분리가 되는지 확인했으며 photodiode-array (PDA) spectrum을 확인하여 동일한 spectrum을 나타내는지 확인하였다.

직선성

Berberine 및 palmatine 표준물질을 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL의 농도로 제조해 HPLC를 이용하여 3회 반복 측정했으며, 각 표준물질의 peak에 대한 면적과 농도비의 관계를 표시하는 검량선을 작성하고 작성한 검량선으로부터 얻어진 상관계수(correlation coefficient, R^2) 값을 통해 직선성을 확인하였다.

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 황백 추출물에 표준용액 berberine 및 palmatine을 12.5, 25, 50 μg/mL의 농도씩 각각 첨가해 일내(Intra-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 하루에 3회 반복하여 HPLC로 분석하였으며, 일간(Inter-day) 정밀성 및 정확성을 확인하기 위해 3일간 반복하여 HPLC로 분석하였다. 분석하여 얻어진 peak의 머무름 시간(retention time)과 PDA spectrum을 비교하여 정성을 하고 작성한 검량선에 시험용액의 peak 면적을 대입하여 berberine과 palmatine의 농도를 계산하였다. 각 결과 값의 표준편차를 결과 값의 평균으로 나눈 비인 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)로 일내 및 일간 정밀성을 확인했으며, 정확성은 다음 식을 이용하여 첨가한 농도에 대비하여 회수된 농도를 계산함으로서 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

Berberine 및 palmatine의 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)는 검량선의 기울기와 표준편차에 근거하는 방법을 사용했으며 다음 식을 이용하여 확인하였다.

Limit of detection (LOD) Limit of quantification (LOQ)

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad \text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

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

FRAP 측정

Ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay는 Kwon 등[19]의 방법을 이용하여 측정하였다. FRAP assay는 ferric ion (Fe^{3+})가 ferrous (Fe^{2+})로 환원되어 TPTZ와 결합하여 blue 계열의 색을 나타내어 환원력을 흡광도 값으로 나타내는 방법이다. Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$)와 acetic acid($C_2H_4O_2$)를 혼합하여 sodium acetate buffer (pH 3.6)를 만들고, 40 mM HCl과 TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s-triazine)를 혼합하여 10 mM TPTZ solution을 만든다. 실험을 위한 반응용액은 sodium acetate buffer (pH 3.6), 10 mM TPTZ (2,4,6-tripyridyl-s- triazine) 및 20 mM $FeCl_3 \cdot 6H_2O$를 10:1:1 비율로 혼합하여 만들어 사용하였다. 조제한 용액 1.5 mL과 DW를 사용하여 농도별로 희석한 시료 50 μL, DW 150 μL를 혼합한 후 37°C에서 4분간 반응 시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Reducing power activity 측정

Reducing power activity는 Sim 등[20]의 방법을 이용하여 실험하였다. Reducing power activity는 ferric-ferricyanide (Fe^{3+}) 혼합물이 수소를 공여하여 유리라디칼을 안정화시켜 ferrous (Fe^{2+})로 전환하는 환원력을 흡광도의 값으로 나타내는 방법이다. 시료 0.5 mL, 0.2 M sodium phosphate buffer 2.5 mL, 1% potassium ferricyanide 2.5 mL를 혼합하여 50°C에서 20분간 반응시켰다. 반응시킨 용액에 10% trichloroacetic acid 2.5 mL를 첨가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상등액 2.5 mL에 3차 증류수 2.5 mL과 0.1% iron (III) chloride 2.5 mL를 첨가하였다. 상온에서 10분간 반응시켜 microplate reader를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 값을 통해 reducing power를 비교하였다.

아질산염 소거능 측정

아질산염 소거능은 Sim 등[20]의 방법을 이용하여 측정하였다. 시료 0.5 mL에 1 mM $NaNO_2$ 용액 0.5 mL를 첨가하고 0.1 N HCl로 반응용액의 pH를 1.2로 보정한 후 반응용액의 최종부피는 증류수를 첨가하여 5 mL로 하였다. 그 후 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 반응액을 1 mL씩 취하여 2% acetic acid 5 mL와 Griess reagent 0.4 mL를 혼합시킨 뒤 상온에서 15분간 반응시킨 후 microplate reader를 이용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아질산염 소거능은 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

아질산염 소거능 = [(Ac-As)/Ac] × 100
Ac: 공시료 흡광도, As : 시료군 흡광도

통계분석

FRAP assay, reducing power activity, 아질산염 소거능 측정은 SAS version 9.4 (SAS institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 one-way ANOVA 검정을 실시하여 유의성은 $P<0.05$ 수준에서 검정하였다.

Results and Discussion

Berberine 및 palmatine의 크로마토그램

Berberine과 palmatine을 동시분석하기 위하여 기존의 분석법[17]을 참고하여 berberine 및 palmatine 표준물질들에 대한 최대흡수 파장을 검토한 결과, 각각 229.7, 265.0, 346.8 nm와 226.2, 274.4, 345.6 nm에서 최대흡수파장을 나타냈다(Fig. 1). 각 물질의 최대흡수파장 및 기존 보고된 논문[21]의 분석 파장인 230 nm에 따른 두 물질의 peak 면적을 비교하여 최적 면적 값을 나타내는 파장 값을 확인한 결과, 232 nm에서 두 물질의 최적 peak 면적 값을 나타내 최적분석파장은 232 nm로 설정하였다.

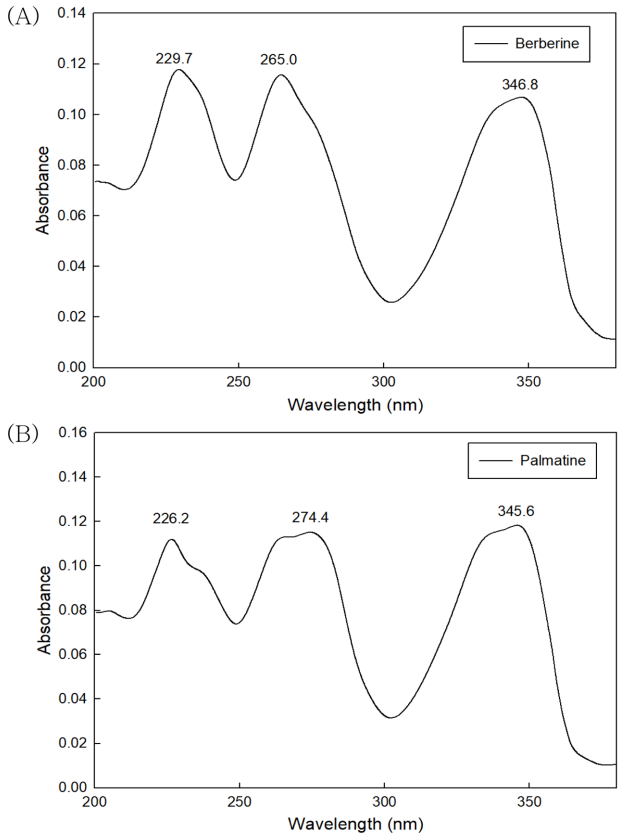

Fig. 1. PDA spectrums of berberine (A) and palmatine (B).

특이성 및 직선성

특이성이란 추출물, 불순물 등이 혼합되어 있는 시료에서 분석대상물질을 선택적으로 측정할 수 있는 능력을 말한다. 표준용액과 혼합 추출물의 chromatogram을 비교하여 berberine과 palmatine의 peak를 확인한 결과 Fig. 2와 같이 berberine과 palmatine이 간섭 없이 선택적으로 분리되었음을 확인하였다. 각 지표물질의 표준용액과 지표물질 혼합용액에서 머무름 시간이 일치하는 것을 확인하였으며, PDA spectrum 결과에서도 동일한 spectrum을 나타냈으며 이를 통해 특이성을 확인하였다(Fig. 1).

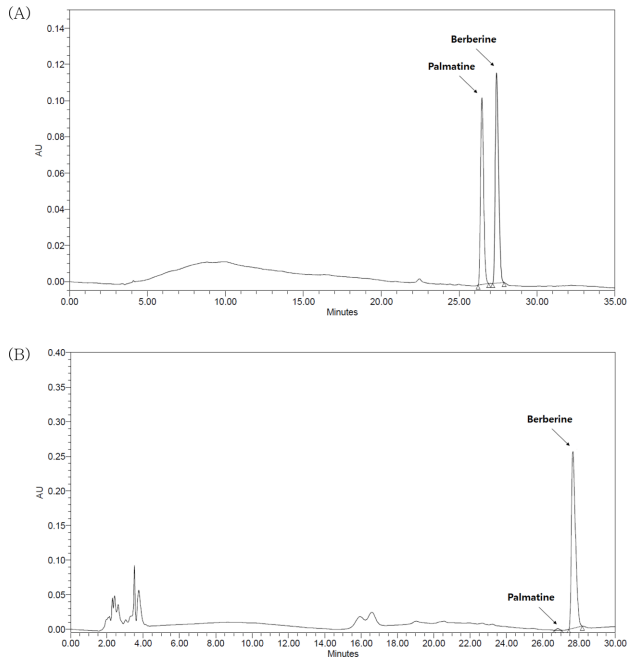

Fig. 2. HPLC chromatograms of berberine and palmatine standard mixture (50 μg/mL, respectively) (A) and *P.amurense* sample (B).

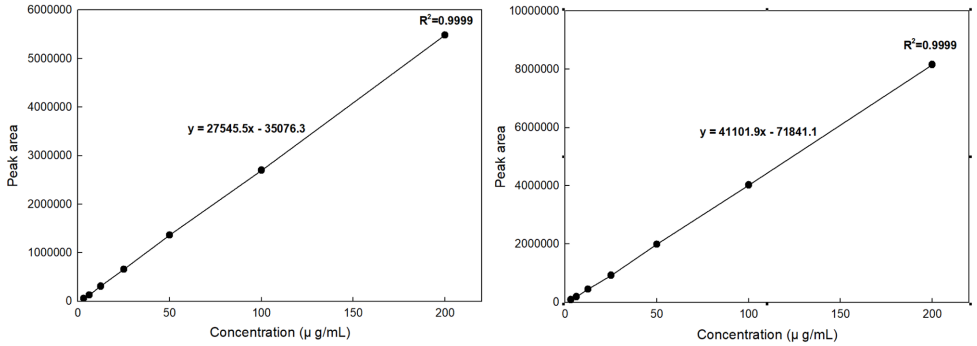

Fig. 3. Calibration curve of berberine and palmatine standard solution.

또한, berberine과 palmatine 표준용액을 3.13, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL 농도로 단계적으로 희석하여 HPLC로 분석한 결과, berberine 및 palmatine의 표준검량선은 각각 y=27256.6x–39147, y=41917.2x–76447로 나타났으며 상관계수(R^2) 값은 두 가지 성분 모두 0.9999로 나타나 우수한 직선성을 보였다(Fig. 3). 이 결과를 통해 berberine의 머무름 시간은 Li 등[17]의 연구와 비슷한 것을 확인할 수 있었고 직선성은 식품의약품안전평가원의 연구[9] 결과와 유사한 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 3).

정밀성 및 정확성

농도를 알고 있는 황백 추출물에 표준용액을 각각 저농도(12.5 μg/mL), 중농도(25 μg/mL), 고농도(50 μg/mL)로 첨가한 뒤 HPLC로 분석했을 때, 각 측정 결과 값 사이의 근접성을 확인하여 정밀성을 평가하며, 회수율을 측정하여 정확성을 평가하였다. 정밀성의 결과는 상대표준편차(RSD)로 확인했다. Berberine 및 palmatine의 정밀성은 일간 정밀성에서 각각 1.27-1.93%, 0.19-2.89%를 나타냈으며 일내 정밀성에서는 0.12-0.56%, 0.36-1.52%로 5% 이하의 우수한 정밀성을 나타냈다. 정확성은 회수율을 측정하여 나타내며 berberine 및 palmatine의 일간 정확성은 98.43-100.73%, 93.20-100.60%를 나타냈고 일내 정확성은 99.56-101.45%, 92.39-97.10%로 우수한 정확성을 나타내었다(Table 2).

검출한계 및 정량한계

검출한계와 정량한계는 ICH 가이드라인에 근거하였으며 berberine 및 palmatine의 검출한계는 각각 0.32 μg/mL, 0.35 μg/mL로 측정됐으며 정량한계는 각각 0.97 μg/mL, 1.06 μg/mL로 나타났다. 이상의 결과를 통해 berberine 및 palmatine은 HPLC를 이용해 동시분석이 가능하며 정량분석이 가능한 것으로 나타났다(Table 3). 이 결과는 식품의약품안전평가원의 연구[9]에 의해 보고된 berberine 및 palmatine의 검출한계인 0.17 μg/mL, 0.18 μg/mL과 정량한계인 0.56 μg/mL, 0.59 μg/mL보다 높게 나타났으나 이는 사용한 기기와 분석조건의 차이에 의한 것으로 사료된다.

FRAP, reducing power 및 아질산염 소거능 활성

Fe^{3+}를 Fe^{2+}로 환원시키는 원리를 이용하는 FRAP assay에서 흡광도 수치는 시료의 환원력을 나타내며, 높은 항산화 활성을 가질수록 흡광도의 수치가 높게 나타난다. Berberine 및 palmatine의 농도를 0.25, 0.5, 1.0 mM로 하여 항산화 활성을 측정한 결과는 Fig. 4와 같다. Berberine은 0.53-2.06, palmatine은 0.55-2.09의 흡광도 값을 나타냈으며, 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid의 FRAP assay

Table 2. Precision and accuracy of berberine and palmatine analysis

Analytes		Concentration (μg/mL)	Mean±SD (μg/mL)	RSD[2] (%)	Recovery (%)
Berberine	Intra-day	12.5	12.54±0.24[1]	1.93	100.32±1.94
		25	24.61±0.35	1.44	98.43±1.42
		50	50.37±0.64	1.27	100.73±1.28
	Inter-day	12.5	12.65±0.01	0.12	101.24±0.12
		25	24.89±0.14	0.56	99.56±0.56
		50	50.73±0.11	0.21	101.45±0.22
Palmatine	Intra-day	12.5	12.26±0.06	0.46	98.04±0.45
		25	23.30±0.04	0.19	93.20±0.17
		50	50.30±1.45	2.89	100.60±2.91
	Inter-day	12.5	12.14±0.04	0.36	97.10±0.35
		25	23.10±0.35	1.52	92.39±1.41
		50	47.75±0.17	0.36	95.50±0.35

[1]Value are mean±SD in triplicate (n=3).
[2]Relative standard deviation.

Table 3. Correlation coefficients of the calibration curves, and limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of berberine and palmatine analysis

Analytes	Range (μg/mL)	Slope	Intercept	Correlation coefficient (R^2)	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)
Berberine	3.13-200	27256.6	-39147	0.9999	0.32	0.97
Palmatine	3.13-200	41917.2	-76447	0.9999	0.35	1.06

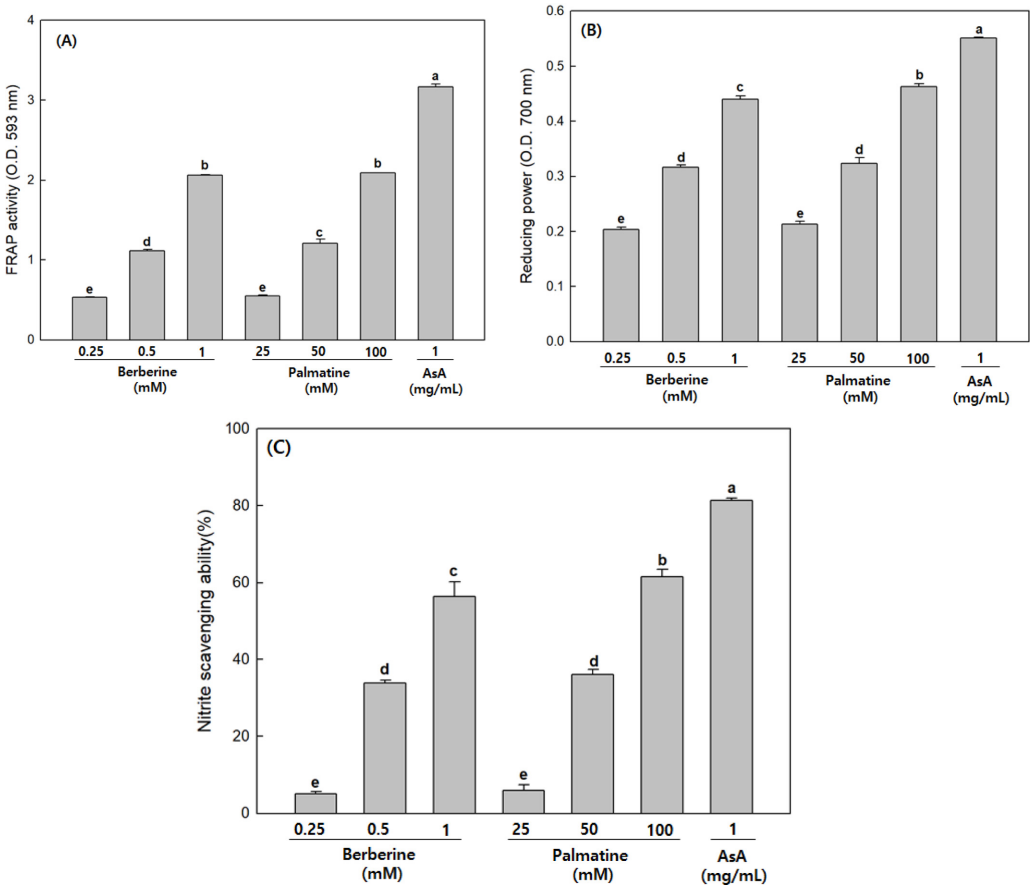

Fig. 4. FRAP assay (A), reducing power (B) and nitrite scavenging activity (C) of berberine and palmatine. Each bar represents the mean±SD of triplicate determinations. Statistical analysis was performed using the one-way ANOVA (P<0.05). [1)]AsA: Ascorbic acid.

에 의한 항산화 활성은 1.0 mg/mL의 농도에서 3.16의 흡광도 값을 나타냈다. Reducing power activity의 측정 결과는 FRAP의 결과와 같은 경향을 나타내었으며, 0.25, 0.5, 1.0 mM의 농도에서 berberine과 palmatine은 각각 0.20±0.01, 0.32±0.00, 0.44±0.01와 0.21±0.01, 0.32±0.01, 0.46±0.01의 결과를 나타냈다. Berberine 및 palmatine의 아질산염 소거능은 농도 의존적으로 증가하여 1 mM의 농도에서 각각 61.50±2.01%와 56.31±4.00%의 값을 확인할 수 있었고 양성대조군으로 사용된 ascorbic acid (0.5 mg/mL)에서는 75.94±0.19%의 결과를 나타냈다. 이는 Shirwaikar 등[22]의 연구와 유사한 결과를 보였음을 확인할 수 있었다. 이 결과들을 통해 berberine과 palmatine 모두 농도 의존적으로 환원력이 높아져 항산화 활성이 증가하였음을 알 수 있었으며, palmatine의 항산화 활성이 berberine보다 더 우수함을 확인할 수 있었다.

Acknowledgement

본 논문은 2020년도 정부의 재원으로 한국연구재단의 사회맞춤형 산업협력 선도대학(LINC+) 육성사업의 일환으로 수행한 기초연구사업임(2020-D-G035-010108).

국문요약

본 연구의 목적은 예로부터 약재로 사용되어 온 황백의 대표적인 지표물질 berberine 및 palmatine의 동시 분석법을 개발 및 검증하고 지표물질들의 항산화 효능을 평가하여 해당 물질들에 대한 기초자료를 제공하고자 하였다. 표준물질들의 동시 분석법은 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 검출한계 및 정량한계를 측정하여 신뢰성을 검증하였으며, 지표물질들의 항산화 활성은 FRAP 활성, reducing power 및 아질산염 소거능 실험으로 측정하였다. HPLC-PDA를 이용하여 berberine과 palmatine의 혼합용액을 분석하였을 때, 두 물질이 간섭 없이 선택적으로 분리되었음을 확인하였다. Berberine 및 palmatine의 검량선의 상관계수 값은 모두 0.9999로 우수한 직선성을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었고 정확성과 정밀성은 농도를 알고 있는 황백 시료에 인위적으로 저농도, 중농도, 고농도의

표준물질 혼합용액을 첨가하여 계산하였다. 정밀성과 정확성은 일간실험 및 일내실험으로 확인하였다. Berberine의 일간 및 일내 정밀성은 1.27-1.93%, 0.12-0.56%의 수준으로 나타났고, palmatine의 일간 및 일내 정밀성은 0.19-2.89%, 0.36-1.52%로 % 이하의 우수한 정밀성을 나타냈으며, berberine의 일간 및 일내 정확성은 98.43-100.73%, 99.56-101.45%로 나타났고 palmatine의 일간 및 일내 정확성은 93.20-100.60%, 92.39-97.10%로 나타났다. Berberine과 palmatine의 검출한계는 각각 0.32 μg/mL, 0.35 μg/mL로 확인되었고 정량한계는 0.97 μg/mL, 1.06 μg/mL로 확인되었다. 분석법 검증결과, 확립된 분석법은 특이성, 직선성, 정밀성, 정확성, 검출한계 및 정량한계가 모두 우수한 분석법임을 검증할 수 있었다. 항산화 활성은 FRAP 활성, reducing power 및 berberine과 palmatine 모두 농도 의존적으로 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 황백은 추후 항산화에 도움을 주는 소재로의 적용 및 항염증 효과로 인한 피부 기능 개선 제품의 소재로서 활용도가 넓을 것으로 사료되며, 황백 내에 존재하는 항산화물질인 berberine 및 palmatine의 동시분석법을 통하여 성분의 함량을 분석하여 효능을 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

Conflict of interests

The authors declare no potential conflict of interest.

ORCID

Gill-Woong Jang	https://orcid.org/0000-0003-1436-7498
Sun-Il Choi	https://orcid.org/0000-0001-7400-6286
Xionggao Han	https://orcid.org/0000-0002-5057-7401
Xiao Men	https://orcid.org/0000-0003-1101-5796
Hee-Yeon Kwon	https://orcid.org/0000-0002-1142-7777
Ye-Eun Choi	https://orcid.org/0000-0001-8298-248X
Byung-Woo Park	https://orcid.org/0000-0002-0052-2461
Jung-Jin Kim	https://orcid.org/0000-0002-1158-7543
Ok-Hwan Lee	https://orcid.org/0000-0001-6855-3136

References

1. Lee, S.M., Park, G.R., Functional cosmetic composition containing extracts of *Scutellariae radix*, *Coptidis rhizoma*, *Phellodendron amurense* and *Houttuynia cordata*. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea,* **7**, 249-258 (2017).
2. Larsen, F.S., Hanifin, J.M., Epidemiology of atopic dermatitis. *Immunol Allergy Clin North Am,* **22**, 1-24 (2002).
3. Kim, S.C., Ahn, K.J., Hann, S.K., Kim, J.W., Sung, K.J., Kye, Y.C., Kim, N.I., Cho, K.H., Kim, K.J., Youn, J.I., Clinico-epidemiologic study on the abuse, misues, and adverse effects of topical dermatologic drugs. *Korean J. Dermatol,* **41**, 1129-1135 (2003).
4. Lee, S.H., Lee, J.A., Shin, M.R., Lee, J.H., Roh, S.S., The protective effect of water extract of *Phellodendri cortex* in chronic reflux esophagitis-induced rats. *Kor. J. Herbology,* **35**, 25-36 (2020).
5. Um, J.N., Min, J.W., Joo, K.S., Kang, H.C., Nitric oxide production and elastase inhibitory activities of extract and its fraction from *Phellodendri cortex*. *KJMCS,* **25**, 22-28 (2017).
6. Wang, W., Zu, Y., Fu, Y., Reichling, J., Suschke, U., Nokemper, S., Zhang, Y., In vitro antioxidant, antimicrobial and anti-herpes simplex virus type 1 activity of *Phellodendron amurense Rupr.* from China. *Am. J. Chinese Med.,* **37**, 195-203 (2009).
7. Kuo, C.L., Chi, C.W., Liu, T.Y., The anti-inflammatory potential of berberine in vitro and in vivo. *Cancer Lett.,* **203**, 127-137 (2004).
8. Kong, W.J., Wei, J., Zuo, Z.Y., Wang, Y.M., Song, D.Q., You, X.F., Zhao, L.X., Pan, H.N., Jiang, J.D., Combination of simvastatin with berberine improves the lipid-lowering efficacy. *Metabolism,* **57**, 1029-1037 (2008).
9. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation., (2018, December 26). *Phellodendron Bark*. Retrieved from https://www.nifds.go.kr/brd/m_184/view.do?seq=13
10. Schmeller, T., Latz-Brüning, B., Wink, M., Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry,* **44**, 257-266 (1997).
11. Chung, S.R., Choi, M.W., Park, I D., Kim, K.H., Effect of berberine on the proinflammatory cytokines production in mice. *Life Sci.,* **20**, 1276-1280 (2010).
12. Creasey, W.A., Biochemical effects of berberine. *Biochem. Pharmacol.,* **28**, 1081-1084 (1979).
13. Tan, W., Lu, J., Huang, M., Li, Y., Chen, M., Wu, G., Gong, J., Zhong, Z., Xu, Z., Dang, Y., Guo, J., Chen, X., Wang, Y., Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Med.,* **6**, 27 (2011).
14. Lee, S.S., Kim, Y.H., Lee, M.K., Inhibition of monoamine oxidase by palmatine. *Arch. Pharm. Res.,* **22**, 529-531 (1999).
15. Semwal, D.K., Rawat, U., Semwal, R., Singh, R., Singh, G.J.P., Anti-hyperglycemic effect of 11-hydroxypalmatine, a palmatine derivative from *Stephania glabra* tubers. *J. Asian Nat. Prod. Res.,* **12**, 99-105 (2010)
16. Yang, H.J., Weon, J.B., Ma, J.Y., Ma, C.J., Simultaneous analysis of three marker components in Hwangryunhaedoktang by HPLC-DAD. *Yakhak Hoeji,* **55**, 64-68 (2011).
17. Li, C.D., Liu, Y., Shi, Y.P., Simultaneous determination of six alkaloids in *Phellodendron amurense* by high-performance liquid chromatography. *Acta Chromatogra.,* **25**, 275-285 (2013).
18. International Conference on Harmonisation, 2005. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1), fourth ed. International Conference on Harmonisation of

Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, EC, Europe, pp. 1-13.
19. Kwon, H.Y., Lee, S.M., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Sim, W.S., Han, X., Jang, G.W., Lee, O.H., Park, D.H., Antioxidant activities of *B. campestris* var. *chinensis* and *B. juncea L. Czern* var. Laciniata Makino baby leaf extracts. *Korean J. Food Preserv.,* **26**, 336-342 (2019).
20. Sim, W.S., Lee, J.S., Lee, S., Choi, S.I., Cho, B.Y., Choi, S.H., Han, X., Jang, G.W., Kwon, H.Y., Choi, Y.E., Kim, J.Y., Kim, J.D., Lee, O.H., Antioxidant effect of extracts from 9 species of forest plants in Korea. *J. Food Hyg. Saf.,* **34**, 404-411 (2019).
21. Jo, B.G., Kang, K.H., Yang, M.H., Development and validation of a HPLC–PDA method for the simultaneous determination of berberine, palmatine, geniposide, and paeoniflorin in Haedoksamul-tang. *Appl. Sci.,* **10**, 5482 (2020).
22. Shirwaikar, A., Shirwaikar, A., Rajendran, K., Punitha, I.S.R., In vitro antioxidant studies on the benzyl tetra isoquinoline alkaloid berberine. *Biol. Pharm. Bull,* **29**, 1906-1910 (2006).