

UPLC를 이용한 밀크씨슬추출물 지표 성분인 실리마린 분석법 검증

유동선^{1,3} · 정경희² · 최승준^{3*}

¹부광약품, ²한국식품연구원, ³서울과학기술대학교 식품공학과

Analytical Validation of Silymarin in Milk Thistle Extract as a Functional Health Ingredient using the UPLC System

Dongsun Yoo^{1,3}, Kyung Hee Jung², and Seung Jun Choi^{3*}

¹Bukwang Pharm. Co., Ltd.

²Korea Food Research Institute

³Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology

Abstract

This study attempted to establish an ultra performance liquid chromatography (UPLC) analysis method for standard determination of silymarin as a health functional food material in *Silybum marianum* extract (milk thistle). UPLC was performed on a Waters Acquity BEH C18 (50×2.1 mm, 1.7 μm) column using a gradient elution of distilled water and methanol at a flow rate of 0.21 mL/min and detection wavelength of 288 nm. The UPLC method showed high linearity in the calibration curve at a coefficient of determination (r^2) of >0.9999, and limit of detection and quantitation for 6 flavonolignans were 0.0167-0.2469 and 0.1648-1.2931 μg/mL, respectively. The recovery of each flavonolignan was in the range of 99.96-100.81%, and the relative standard deviation for precision of each flavonolignan was less than 1.0%. The UPLC method established in this study was more specific for the quantitative determination of silymarin than the HPLC method. Also, since the UPLC method is shorter in the equipment operation time and smaller in the amount of used solvent than the HPLC method, UPLC is expected to have higher energy efficiency and lower environmental impact compared with HPLC.

Key words: HPLC, milk thistle, *Silybum marianum* extract, silymarin, UPLC

서 론

건강기능식품은 일상 식생활에서 부족할 수 있는 영양소 혹은 신체 여러 부위에 이로운 기능을 가진 기능성 원료를 사용하여 제조함으로써 건강을 유지하는 데 도움을 주는 식품이다. 기능성 원료에는 건강기능식품공전에 수록된 고시형 원료와 공전에 등재되어 있지 않고 식품의약품안전처에서 개별적으로 인정하는 개별인정원료가 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2017). 개별인정원료 역시 인정 받은 후 6년이 지나고, 품목제조신고가 50건 이상이 되는 등 몇 가지 조건이 충족되면 고시형 원료로 전환이 가능해진다. 이러한 원료로 제조된 건강기능식품의 기능성은 크게 3가지 기능성으로 구분할 수 있다(Ministry of Food and

Drug Safety, 2017). 첫 번째로 질병 발생위험감소기능이 있으며 대표적으로 골다공증과 충치 발생위험감소가 있다. 두 번째는 생리활성기능이 있는데 기억력 개선, 간 건강, 체지방 감소, 혈당조절 등 약 30여 개의 생리활성기능이 있다. 세 번째는 영양소 기능으로 비타민 및 무기질, 단백질, 필수지방산 등의 기능이 있다. 이런 여러 기능성을 가진 건강기능식품은 매년 꾸준한 성장세를 나타내며 국내 뿐만 아니라 전 세계적으로 시장이 커지고 있으며 국내외 노령인구의 증가와 더불어 앞으로의 성장 전망도 밝은 편이다(Ministry of Food and Drug Safety, 2017). 이러한 건강기능식품 중에서 간 기능개선에 도움을 주는 기능성 원료에는 밀크씨슬추출물, 표고버섯균사체, 복분자추출분말, 헛개나무과병추출물 등이 있는데 간 기능 건강기능식품 중에는 밀크씨슬추출물이 기능성 원료로 많이 사용되고 있다.

해바라기와 데이지가 속해있는 국화과 식물인 엉겅퀴(*Silybum marianum*)를 그대로 주정(물·주정 혼합물 포함) 추출하거나 압착 또는 핵산으로 탈지하여 주정(물·주정 혼합물 포함) 추출한 후 여과, 농축, 정제하여 제조한 것을

*Corresponding author: Seung Jun Choi, Mail address: Department of Food Science and Technology, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6739; Fax: + 82-2-976-6460

E-mail: choisj@seoultech.ac.kr

Received March 16, 2018; revised April 23, 2018; accepted May 3, 2018

밀크씨슬(milk thistle)이라고 한다. 밀크씨슬에 함유된 기능 성분은 실리마린(silymarin)이라고 하며, silybin A, silybin B, isosilybin A, isosilybin B, silychristin, silydianin 등의 플라보노리그난(flavonolignan) 화합물이 실리마린의 약 70%를 차지한다(Choo et al., 2009). 기능성분인 실리마린이 320-660 mg/g을 함유되어 있어야만 밀크씨슬추출물을 건강기능식품의 기능성원료로 사용이 가능하다(Ministry of Food and Drug Safety, 2016a).

밀크씨슬추출물은 예전부터 간장약으로 이용됐으며 그 효능이 수많은 연구를 통해 보고되어 있다. 이것의 간 보호작용은 실리마린의 플라보노리그난 화합물들이 간세포와 독소와의 결합을 방해하는데, 이런 작용으로 유해물질의 세포 내부로의 침입을 방지함으로써 간세포 보호 작용을 한다(Saller et al., 2001; Carla Pereira et al., 2013; Ni & Wang, 2016; Baghbahadorani et al., 2017; Heo et al., 2017; Zaulet et al., 2017). 그리고 실리마린은 간의 해독작용에 필요한 성분인 글루타싸이온(glutathione)의 산화를 감소시키며 동시에 고갈을 방지한다(Mira et al., 1994). 실리마린은 또한 항산화제로서 자유라디칼을 제거하고, 생체 내 항산화물질의 양을 증가시켜 과산화로 인한 세포괴사를 막는다(Lieber et al., 2003). 그 외에도 염증 매개 물질인 프로스타글란딘(prostaglandin)과 류코트라이엔(leukotriene)의 생성을 억제하여 항염증작용을 나타내는 것으로 알려져 있고(Dehmlow et al., 1996), 실리마린과 인터페론(interferon)의 조합이 C형간염의 치료에 도움이 된다는 연구(Ashfaq et al., 2011), 실리마린의 면역조절제로서의 기능(Esmacil et al., 2017), 방사선 보호역할(Marzbani et al., 2017) 등 다양한 기능성이 알려져 있다.

이러한 기능성으로 밀크씨슬추출물을 주요 성분으로 한 수많은 제품이 건강기능식품시장에 출시되어 있다. 현재 실리마린을 분석하는 방법은 밀크씨슬추출물로부터 high performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 분석법이 건강기능식품 기준규격에 개정 및 고시되어 있다(Ministry of Food and Drug Safety, 2016b). HPLC 분석법은 분석에 소요될 뿐만 아니라 이와 동반하여 많은 양의 용매가 필요하고, 그에 따르는 폐기물양의 증가, 기기의 가동률 증가 등 여러 단점이 존재한다. 그에 비해 ultra performance liquid chromatography (UPLC)는 HPLC 컬럼과 비교하여 2 μm 내외 작은 직경을 갖는 충전 입자를 사용한 컬럼을 사용하여 고압에서 분석이 가능하기 때문에 분석 시간이 단축될 뿐만 아니라 분리능과 감도가 높은 장점이 있다(de Villiers et al., 2006). 그러므로 본 연구에서는 UPLC를 이용한 실리마린을 분석하는 조건 및 방법을 설정하고, 그 방법의 특이성(specificity), 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 완건성(robustness) 등을 평가하여 설정된 방법을 검증하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용한 실리마린 표준물질은 (주)천연바이오(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 실리마린 표준물질은 silychristin (순도 98.1%), silydianin (순도 98.2%), silybin (A+B) (순도 98.1% (49.0%의 silybin A와 49.1%의 silybin B)), isosilybin A+B (순도 97.2% (82.8%의 isosilybin A와 14.4%의 isosilybin B))으로 구성되어 있으며, 실리마린 각 표준물질의 분자구조는 Fig. 1에 나타내었다. 추출과 분석에 사용된 메탄올(methanol)은 HPLC용 특급(Fischer Brand, Waltham, MA, USA)을 구입하여 사용하였으며, 이동상으로 사용되는 인산(phosphoric acid)은 HPLC 등급에 준하는 것을 Junsei Chemicals (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

표준용액의 조제

실리마린 표준물질 silychristin, silydianin, silybin A와 silybin B의 혼합물, isosilybin A와 isosilybin B의 혼합물 각각을 10 mg씩 정밀히 칭량하여 메탄올에 용해한 후, 메탄올로 최종 부피를 100 mL로 정용하여 표준원액으로 하고 이를 희석하여 표준용액으로 사용하였다. 실리마린 표준물질의 순도를 고려하면 실리마린 표준원액 100 mL에는 9.81 mg의 silychristin, 9.82 mg의 silydianin, 4.90 mg의 silybin A, 4.91 mg의 silybin B, 8.28 mg의 isosilybin A, 1.41 mg의 isosilybin B가 함유되어 있다.

기기 조건 및 조작

실리마린 표준물질의 함량을 측정하기 위해 건강기능식품공전의 방법에 따라 HPLC (Waters Co., Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다. 전처리한 각 시료 20 μL 를 주입하였으며, 컬럼은 YMC Pack Pro C18 (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) HPLC column (YMC, Tokyo, Japan), 검출기는 Waters 2487 dual absorbance detector (Waters Co.)를 사용하였다. UPLC system은 Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm) column (Waters Co.)을 사용하였으며, 검출기는 Acquity TUV detector (Waters Co.)를 사용하였다. HPLC 및 UPLC system의 이동상 중 이동상 A는 메탄올:탈이온수:인산이 20:80:0.5 (V/V/V)이 되도록 제조하였으며, 이동상 B는 메탄올:탈이온수:인산이 80:20:0.5 (V/V/V)이 되도록 제조하였다. HPLC 및 UPLC의 분석 조건은 Table 1과 같다.

정량 계산

각 농도의 표준용액으로 silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A 및 isosilybin B의 검량선을 작성한 후, 시험용액 중 실리마린 함량을 구하였다. 시험용액의

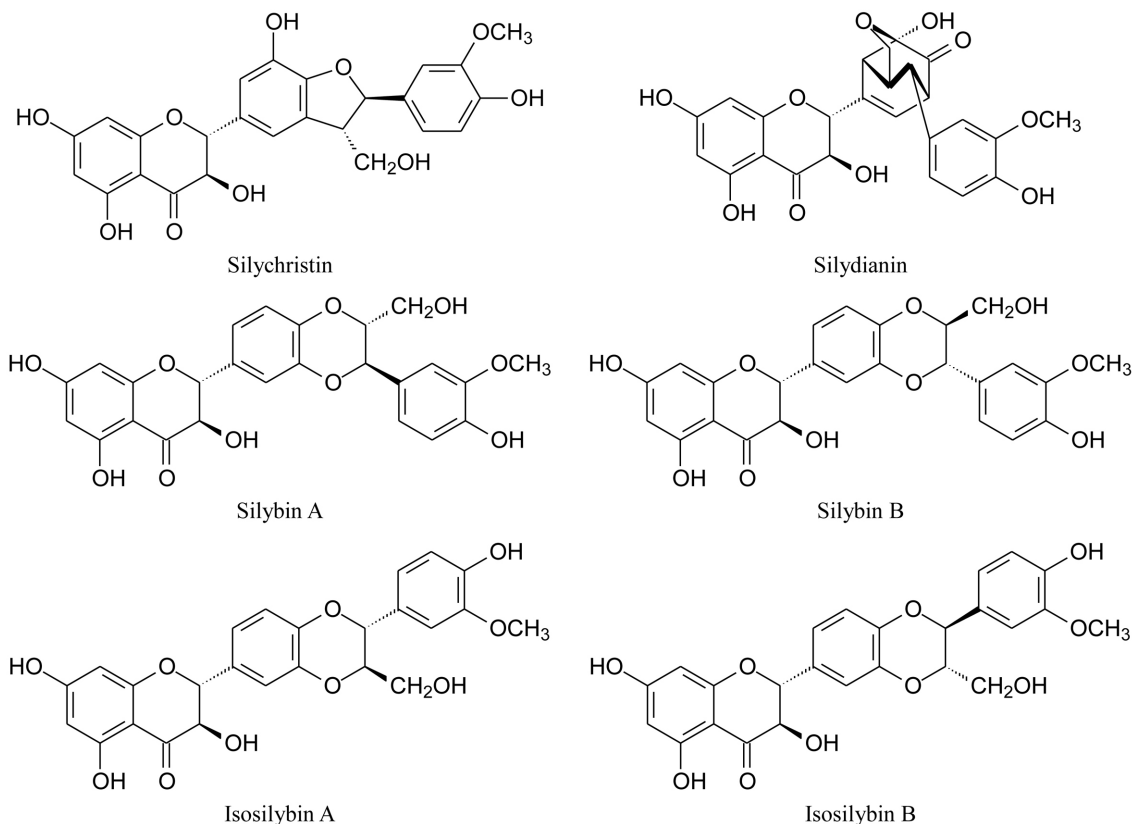


Fig. 1. Molecular structures of six flavonolignans in silymarin.

Table 1. Analytical conditions of HPLC and UPLC for the quantitative analysis of silymarin

| Parameter | HPLC condition | | | UPLC condition | | |
|-------------------------|--|----------|----------|--|----------|----------|
| Column | YMC Pack Pro C18 (240 mm × 4.6 mm × 5 μm) | | | Waters Acquity UPLC BEH C18 (50 mm × 2.1 mm × 1.7 μm) | | |
| Injection volume | 20 μL | | | 0.5 μL | | |
| Column oven temperature | 35°C | | | 30°C | | |
| Mobile phase | Min | Eluent A | Eluent B | Min | Eluent A | Eluent B |
| | 0 | 85 | 15 | 0.0 | 85 | 15 |
| | 5 | 85 | 15 | 0.6 | 85 | 15 |
| | 20 | 55 | 45 | 3.6 | 55 | 45 |
| | 40 | 55 | 45 | 6.0 | 55 | 45 |
| | 41 | 85 | 15 | 6.2 | 85 | 15 |
| | 55 | 85 | 15 | 7.0 | 85 | 15 |
| Flow rate | 1.0 mL/min | | | 0.21 mL/min | | |
| Detection wavelength | 288 nm | | | 288 nm | | |

실리마린 함량은 아래의 식으로 구한 silychristin, silydianin, silybin A, silybin B, isosilybin A 및 isosilybin B의 각 함량을 합하여 구하였다.

$$\text{실리마린 함량(mg/g)} = A \times B \times P / S$$

A = 시험용액 중의 각 플라보노이드의 농도(μg/mL)

B = 시험용액의 전량(mL)

P = 표준물질의 순도

S = 시료채취량(mg)

분석법 검증

특이성(specificity)은 실리마린 표준용액을 HPLC와 UPLC로 분석하여 크로마토그램상의 머무름 시간(retention time)과 스펙트럼(spectrum)을 비교하였으며, silychristin, silydianin,

silybin A, silybin B, isosilybin A 및 isosilybin B의 각 성분이 충분히 분리되고 선택적으로 정확하게 검출이 가능한가를 검증하였다. 분석대상물질 피크와 가장 가까운 잠재적 간섭피크 상의 분리도는 1.5 이상이어야 분석대상물질이 정확하게 분리·분석된 것이므로(Ministry of Food and Drug Safety, 2015), 실리마린 표준물질 피크 사이의 분리도가 1.5 이상인지 확인하였다.

직선성(linearity)은 분석대상물질인 실리마린의 농도에 대한 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는지 알아보기 위한 것으로, 실리마린 표준원액(400 µg/mL)을 메탄올로 순차적으로 희석하여 제조한 표준용액(25-400 µg/mL)을 HPLC와 UPLC로 분석한 후, 피크 면적과 시료 농도를 변수로 하여 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 결정계수(coefficient of determination, r^2) 값을 이용하여 직선성을 확인하였다.

정량한계(limit of quantitation, LOQ)와 검출한계(limit of detection, LOD)는 실리마린 표준용액으로 검량선을 작성한 후 검량선에서 기울기의 평균값과 y절편에 대한 표준편차를 구하여 아래의 식으로 정량한계와 검출한계를 계산하였다.

$$\text{LOQ} = 10 \times y\text{절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

$$\text{LOD} = 3.3 \times y\text{절편의 표준편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

정확성(accuracy)은 측정값(measured value)의 참값(true value)에 대한 회수율을 나타내었다. 측정값은 조제한 정확성 측정용 용액의 농도이며, 참값은 검량선식에 정확성 측정용 용액의 면적값을 대입하여 구하여진 농도이다. 실리마린 표준원액을 직선성 항목의 농도범위(25, 100 및 400 µg/mL)에 포함되도록 희석하여 정확성 측정용 용액을 조제하여 3회 반복 측정하였으며 측정값이 참값에 근접한 정도를 백분율로 나타내었다.

정밀성(precision)은 실리마린 표준원액을 HPLC와 UPLC에 6회 반복적용하여 얻은 피크의 머무름 시간과 면적의 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 측정하였다. 실험실 내 정밀성(intermediate precision)은 동일 실험실내 동일한 실험장비와 기구 등을 이용하여 서로 다른 실험실에 다른 실험자가 정밀성 항목을 검증하여 두 실험자의 상대표준편차를 계산하였다.

완건성(robustness)은 조제한 시험용액이 시간이 흐름에 영향을 받는지의 여부를 확인하기 위하여 매 6시간마다 총 24시간동안 5회 실시하여 평가를 실시하였다.

건강기능식품 내에서의 실리마린 분석

정량분석용 검체는 D약품에서 생산한 밀크씨슬추출물 함유 건강기능식품 제품(실리마린 함량 130 mg/12.6 mL)을 사용하였다. 검체 약 1.3 g에 90 mL의 메탄올을 가하여 30분간 초음파 추출한 후, 상온에서 냉각 후 메탄올로 최종 부피를 100 mL로 정용한 후, 0.45-µm 막거르개(membrane

filter)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

특이성(specificity)

특이성은 불순물, 분해물, 배합성분 등이 혼재한 상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력이므로, 본 연구의 분석조건이 실리마린 표준물질 6가지 성분을 정확하게 측정할 수 있는지 알아보기 위하여 특이성을 검증하기 위한 분석을 시행하였다. HPLC에서의 분리능(resolution)은 silychristin과 silydianin이 3.30, silydianin과 silybin A가 14.83, silybin A와 silybin B가 4.04, silybin B와 isosilybin A가 10.30, isosilybin A와 isosilybin B가 2.97이었으며, UPLC에서의 분리능은 silychristin과 silydianin이 3.18, silydianin과 silybin A가 12.09, silybin A와 silybin B가 2.20, silybin B와 isosilybin A가 6.36, isosilybin A와 isosilybin B가 1.55로서 두 기기에서의 분리도가 모두 1.5 이상으로 높은 분리능을 확인하였다(Ministry of Food and Drug Safety, 2015). Fig. 2는 C18 컬럼을 이용한 실리마린 6가지의 표준물질을 동시분리·분석한 HPLC와 UPLC의 크로마토그램을 비교하여 보여주고 있다. 실리마린 표준물질인 6가지 플라보노리그난 화합물의 피크는 서로 겹치지 않았으며, 각 표준물질 간의 분리도가 HPLC와 UPLC 분석법에서 1.5 이상이 됨을 확인하여 특이성을 확보하였다.

직선성(linearity)

직선성이란 검체 중 분석대상물질의 양 또는 농도에 비례하여 일정 범위 내에서 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력으로 HPLC와 UPLC 분석법에서 모두 결정계수(r^2) 값이 0.999 이상으로 매우 우수한 직선성을 보였다(Table 2). 검출한계(LOD)는 검체 중 존재하는 분석 대상물질의 검출 가능한 최소량을 의미하며, 정량한계(LOQ)는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체 중 분석대상물질의 최소량을 의미한다(Kwon et al., 2017). HPLC 분석법에서 실리마린 표준물질의 검출한계는 0.0167-0.2469 µg/mL, 정량한계는 0.0506-0.1682 µg/mL 수준으로 나타났으며, UPLC 분석법에서는 0.0544-0.4267 µg/mL 및 0.1648-1.2931 µg/mL 수준이었다. UPLC 분석법에서 얻어진 검출한계 및 정량한계는 HPLC 분석법에서 얻어진 결과와 비교하여 약간 높은 수준을 보였다. 본 연구는 밀크씨슬추출물의 표준화를 위해 설정된 지표물질인 실리마린의 UPLC 분석을 위한 검출한계 및 정량한계를 검증한 것으로 충분히 본 연구에서의 활용이 가능한 것으로 판단된다.

정확성(Accuracy)

실리마린 표준용액을 25, 100 및 400 µg/mL 농도로 준비하여 회수율을 확인하여, 실리마린의 측정값이 참값에

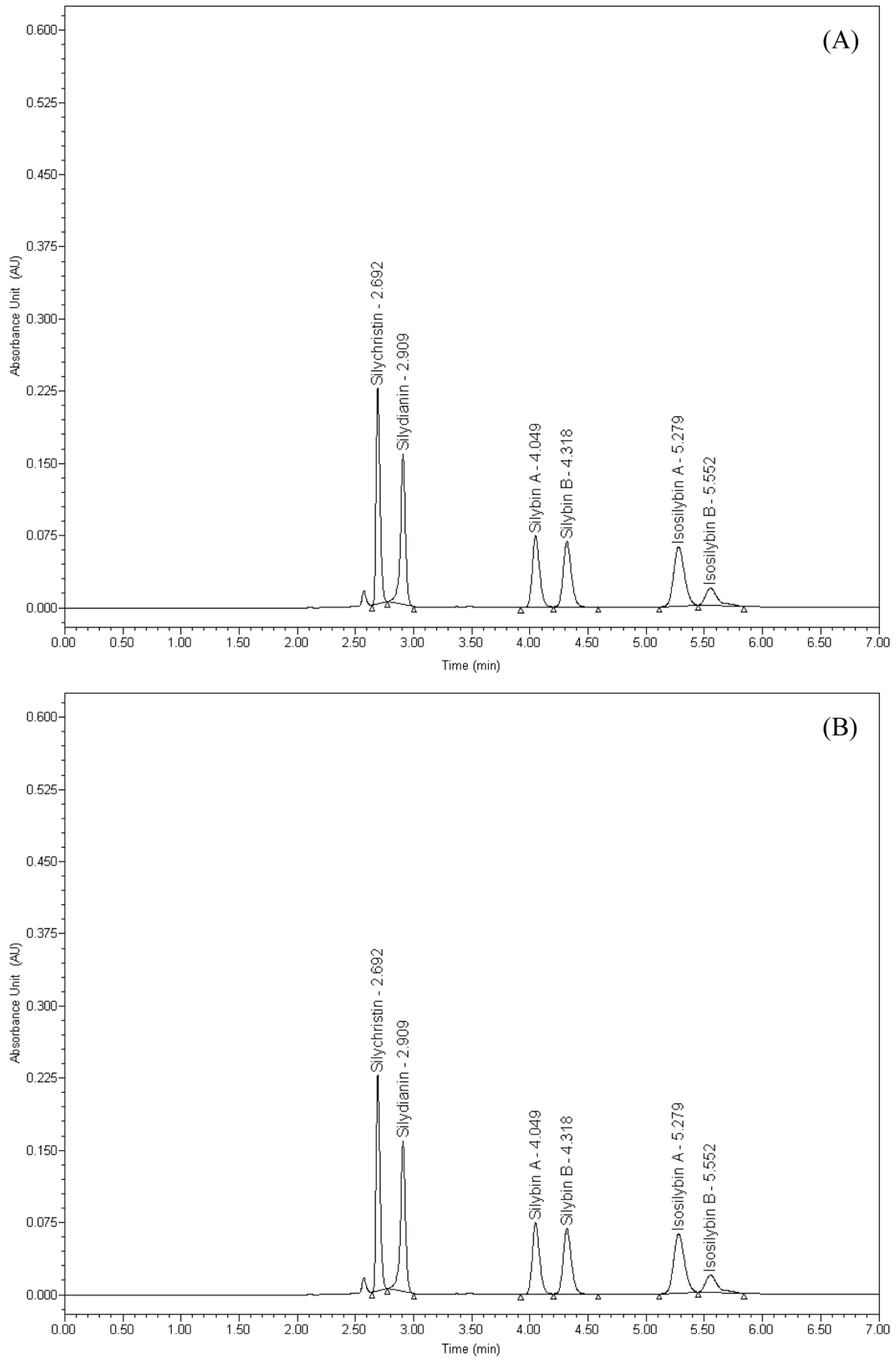


Fig. 2. HPLC (A) and UPLC (B) chromatograms of silymarin analysis.

Table 2. Results of linearity validation of HPLC and UPLC methods (Linearity of silymarin analysis using HPLC and UPLC methods)

| Parameter | Silychristin | Silydianin | Silybin A | Silybin B | Isosilybin A | Isosilybin B |
|--|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| HPLC method | | | | | | |
| Regression equation | $y = 45119x + 9051$ | $y = 44869x + 3037$ | $y = 57429x + 2406$ | $y = 57272x + 3276$ | $y = 44100x + 3870$ | $y = 82339x + 91$ |
| Coefficient of determination (r^2) | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 |
| LOD/LOQ ($\mu\text{g/mL}$) | 0.0329/0.0998 | 0.2469/0.7482 | 0.0167/0.0506 | 0.0529/0.1602 | 0.0556/0.1686 | 0.0206/0.0623 |
| UPLC method | | | | | | |
| Regression equation | $y = 5339x + 288$ | $y = 4620x + 174$ | $y = 6482x + 159$ | $y = 6626x + 301$ | $y = 4745x + 174$ | $y = 9172x + 140$ |
| Coefficient of determination (r^2) | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 | 0.9999 |
| LOD/LOQ ($\mu\text{g/mL}$) | 0.3568/1.0813 | 0.4267/1.2931 | 0.1566/0.4745 | 0.2071/0.6276 | 0.3920/1.1878 | 0.0544/0.1648 |

근접한 정도를 계산하였다(Table 3). HPLC 분석법에서 silychristin의 회수율은 98.58%, silydianin의 회수율은 98.88%, silybin A의 회수율은 98.93%, silybin B의 회수율은 98.71%, isosilybin A의 회수율은 98.80%, isosilybin B의 회수율은 98.11%으로 나타났다. UPLC 분석법에서의 silychristin의 회수율은 100.06%, silydianin의 회수율은 100.21%, silybin A의 회수율은 100.36%, silybin B의 회수율은 99.96%, isosilybin A의 회수율은 100.29%, isosilybin B의 회수율은 101.15%으로 나타났다. HPLC 및 UPLC 분석법에서의 평균 회수율은 각각 98.67 및 100.34%였으며, 상대표준편차는 모두 2.0% 이하로 정확성이 있음을 알 수 있었다. UPLC 분석법의 평균 회수율이 HPLC 분석법보다 100%에 근접한 결과를 보였으며, UPLC 분석법이 HPLC 분석법에 비해 실리마린 분석에 높은 정확성을 갖음을 확인하였다.

정밀성(precision)

정밀성은 균일한 검체에서 여러 번 채취하여 얻은 시료를 정해진 조건에 따라 측정하였을 때, 각 시험 결과가 어느 정도 근접성을 갖는지 나타낸다(Ministry of Food and Drug Safety, 2015). 정밀성 측정은 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 제조한 실리마린 표준용액을 6회 반복하여 실시하였으며, 실리마린 각 표준물질의 피크 면적과 머무름 시간의 상대표준편차(RSD)로 나타내었다.

HPLC를 이용한 분석법의 검증 결과(Table 4), 실리마린의

Table 3. Recovery tests for silymarin using HPLC and UPLC methods (Recovery of silymarin analysis using HPLC and UPLC methods)

| Compound | HPLC method | | UPLC method | |
|------------------|--------------|---------|--------------|---------|
| | Recovery (%) | RDS (%) | Recovery (%) | RDS (%) |
| Silychristin | 98.58 | 0.84 | 100.06 | 0.32 |
| Silydianin | 98.88 | 0.76 | 100.21 | 0.29 |
| Silybin A | 98.93 | 0.81 | 100.36 | 0.28 |
| Silybin B | 98.71 | 0.78 | 99.96 | 0.26 |
| Isosilybin A | 98.80 | 0.77 | 100.29 | 0.37 |
| Isosilybin B | 98.11 | 0.79 | 100.81 | 0.71 |
| Average recovery | 98.67 | | 100.34 | |

RSD: relative standard deviation

일간 피크 면적 상대표준편차는 1.28-1.34%, 일간 피크 머무름 시간 상대표준편차는 0.34-0.96%이었으며, UPLC를 이용한 분석법에서 실리마린의 일간 피크 면적 상대표준편차는 0.46-0.51%, 일간 머무름 시간 상대표준편차는 0.03-0.05%이었다. HPLC 분석법에서 전 성분 피크 면적 상대표준편차는 1.30%이고 피크 머무름 시간 상대표준편차는 0.66%이며, UPLC 분석법에서는 전 성분 피크 면적 상대표준편차는 0.50%이고 피크 머무름 시간 상대표준편차는 0.04%로 현저히 낮은 값을 갖으므로, 개발된 UPLC 분석법이 실리마린의 정량분석이 가능한 재현성이 있음을 확인하였다.

실험실 내 정밀성은 HPLC 분석법에서 피크 면적 상대표준편차는 0.86-1.07%, 피크 머무름 시간 상대표준편차는 0.79-2.12%로, UPLC 분석법에서는 피크 면적 상대표준편차는 0.36-0.40%, 피크 머무름 시간 상대표준편차는 0.03-0.21%로 나타났으며(Table 5), 2% 이하로서 실험실 내 정밀성이 있음을 확인하였다. 특히, UPLC 분석법에서는 얻은 상대표준편차들이 HPLC 분석법에서 얻은 값들보다 현저히 낮음을 확인하였다.

완건성(robustness)

실리마린 표준용액을 24시간 동안 매 6시간마다 총 5회 주입하여 시간에 대한 완건성을 각 회수율, 피크 면적 및 머무름 시간의 상대표준편차로 나타내었다. HPLC 분석법

Table 4. Precision of silymarin analysis using HPLC and UPLC methods

| | Compound | Peak area (RSD%) | Retention time (RSD%) |
|------|--------------|------------------|-----------------------|
| HPLC | Silychristin | 1.28 | 0.34 |
| | Silydianin | 1.33 | 0.38 |
| | Silybin A | 1.27 | 0.64 |
| | Silybin B | 1.28 | 0.73 |
| | Isosilybin A | 1.29 | 0.89 |
| | Isosilybin B | 1.34 | 0.96 |
| UPLC | Silychristin | 0.50 | 0.03 |
| | Silydianin | 0.46 | 0.03 |
| | Silybin A | 0.49 | 0.04 |
| | Silybin B | 0.50 | 0.05 |
| | Isosilybin A | 0.51 | 0.05 |
| | Isosilybin B | 0.51 | 0.05 |

Table 5. Intermediate precision of silymarin analysis using HPLC and UPLC methods

| | Compound | Peak area (RSD%) | Retention time (RSD%) |
|------|--------------|------------------|-----------------------|
| HPLC | Silychristin | 0.87 | 0.79 |
| | Silydianin | 0.94 | 0.90 |
| | Silybin A | 0.86 | 1.45 |
| | Silybin B | 0.87 | 1.63 |
| | Isosilybin A | 0.89 | 1.98 |
| | Isosilybin B | 1.07 | 2.12 |
| UPLC | Silychristin | 0.38 | 0.03 |
| | Silydianin | 0.36 | 0.03 |
| | Silybin A | 0.37 | 0.21 |
| | Silybin B | 0.38 | 0.04 |
| | Isosilybin A | 0.38 | 0.04 |
| | Isosilybin B | 0.40 | 0.04 |

에서 전 성분 피크 면적 상대표준편차는 0.60%, 머무름 시간 RSD값은 3.39%으로 나타났으며, UPLC 분석법에서는 전 성분 피크 면적의 상대표준편차는 0.44%, 머무름 시간의 상대표준편차는 0.23%로 24시간 동안 표준용액의 완전성이 확인되었으며 완전성 항목 역시 UPLC 분석법에서 편차가 적었다.

검체 함량

본 시험법의 검증과정을 통하여 UPLC 분석법이 밀크씨슬추출물 내 실리마린의 정량에 이용될 수 있는 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다. 시중에 유통되는 밀크씨슬추출물 함유 건강기능식품을 대상으로 3회 반복 실험하여 실리마린 함량을 측정된 결과, HPLC 분석법에서는 검체 12.6 mL 중의 실리마린 함량은 123.09 mg으로 94.68% (상대표준편차 0.29%) 함량으로 계산되었고, UPLC 분석법에서는 132.23 mg으로 101.72% (상대표준편차 0.20%)로 계산되어 UPLC 분석법에서 상대적으로 100%에 근접한 결과값을 보였다.

만약 검체 100개를 분석할 경우, HPLC 분석법의 총 분석시간은 95시간 30분, 총 이동상 소모량은 6,215 mL이고 이동상 소모량 중 메탄올 소모량은 2,450 mL이며, 기기 안정화 시간 포함하여 기기가동시간은 약 96시간, 이에 따른 폐액량은 약 6,300 mL에 이른다. 그에 비해 UPLC 분석법의 총 분석시간은 약 13시간, 총 이동상 소모량은 168 mL이며 이동상 소모량 중 메탄올 소모량은 74 mL이며 기기 안정화 시간 포함하여 기기가동시간은 약 14시간, 이에 따른 폐액량은 약 200 mL에 불과하였다.

요 약

밀크씨슬추출물의 지표물질인 실리마린 분석법의 효율성

재고를 위하여 건강기능식품공전의 HPLC 분석법과 UPLC를 이용한 신규 분석법을 비교하여 분석법 검증 및 정량적 평가를 실시하였다. UPLC를 이용한 신규 분석법을 검증하기 위하여 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 실험실 내 정밀성, 완전성 등 6개의 검증항목을 선정하여 UPLC 분석법 검증을 실시하였다. 특이성에서 1.5 이상의 분리능을 보여 6가지 실리마린 표준물질이 HPLC 및 UPLC 분석법 모두에서 선택적으로 정확하게 검출됨을 확인하였다. 직선성에서는 25-400 µg/mL의 농도에서 결정계수 값이 0.9999 이상으로 거의 직선에 가까운 값을 보였다. 정확성에서 UPLC를 이용한 신규 분석법의 회수율은 평균 99%이상으로 HPLC 분석법보다 높은 회수율을 보였으며, 회수율편차 역시 50% 이상 감소하였다. 정밀성에서도 UPLC 분석법에서 얻어진 피크 면적의 상대표준편차가 HPLC를 이용한 기존 분석법의 절반 이하로 감소하여 검증 항목에서 월등한 결과값을 보였다. 또한 실험실 내 정밀성에서도 UPLC 분석법에서 얻어진 상대표준편차가 HPLC 분석법에 얻어진 상대표준편차보다 현저히 낮음을 확인하였다. 분석법 검증 결과 6개의 검증항목에서 HPLC와 UPLC 분석법 모두 적합하게 검증되었으며, 검증항목 중 정확성, 정밀성, 실험실 내 정밀성 및 완전성 항목에서 UPLC 분석법의 검증값이 HPLC 분석법보다 뛰어났다. 이상의 결과로 UPLC를 사용한 실리마린의 분석법은 건강기능식품의 실리마린을 분석하는데 충분히 효율적인 분석법이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

References

- Ashfaq UA, Javed T, Rehman S, Nawaz Z, Riazuddin S. 2011. Inhibition of HCV 3a core gene through Silymarin and its fractions. *Virology* 8:153.
- Baghbahadorani FK, Miraj S. 2017. The impact of silymarin on improvement of hepatic abnormalities in patients with severe preeclampsia: a randomized clinical trial. *Electron. Physician* 9:5098-5106.
- Choo SJ, Ryoo IJ, Kim YH, Xu GH, Kim KH, Han CS, Kim SJ, Kim JW, Son ED, Yoo ID. 2009. Hypopigmentary effect of milk thistle extract silymarin. *J. Soc Cosmet. Sci. Korea* 35:151-158.
- Dehmlow C, Erhard J, de Groot H. 1996. Inhibition of Kupffer cell functions as an explanation for the hepatoprotective properties of silibinin. *Hepatology* 23:749-754.
- de Villiers A, Lestremau F, Szucs R, Gilbert S, David F, Sandra P. 2006. Evaluation of ultra performance liquid chromatography. Part I. Possibilities and limitations. *J. Chromatogr. A* 1127:60-69.

- Esmail N, Anaraki SB, Gharagozloo M, Moayedi B. 2017. Silymarin impacts on immune system as an immunomodulator: One key for many locks. *Int. Immunopharmacol.* 50:194-201.
- Graf TN, Cech NB, Polyak SJ, Oberlies NH. 2016. A validated UHPLC-tandem mass spectrometry method for quantitative analysis of flavonolignans in milk thistle (*Silybum marianum*) extract. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 126:26-33.
- Heo E, Kim DK, Oh SH, Lee JK, Park JH, Chung HS. 2017. Effect of prophylactic use of silymarin on anti-tuberculosis drugs induced hepatotoxicity. *Tuberc. Respir. Dis.* 80:265-269.
- Kwon JG, Seo C, Choi Y-H, Choi CW, Kim JK, Jeong W, Lee JE, O KH, Hong SS. 2017. Validation of method determining coixol in *Coix lachrymal-jobi* var. *ma-yuen* roots extract. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 46: 952-956.
- Lieber CS, Leo MA, Cao Q, Ren C, DeCarli LM. 2003. Silymarin retards the progression of alcohol-induced hepatic fibrosis in baboons. *J. Clin. Gastroenterol.* 37:336-339.
- Marzban M, Anjamshoa M, Jafari P, Masoumi H, Ahadi R, Fatehi D. 2017. Effects of gamma rays on rat testis tissue according to the morphological parameters and immunohistochemistry: radio-protective role of silymarin. *Electron. Physician* 9:4524-4532.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2015. Analytical method guideline about validation of drugs and etc. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2016a. Standard and Specification of Health Functional Food. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. p. 65-66.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2016b. Standard and Specification of Health Functional Food. Ministry of Food and Drug Safety. Cheongju, Korea. p. 423-426.
- Ministry of Food and Drug Safety. 2017. Health Functional Food Information monitoring. Available from: http://www.foodsafetykorea.go.kr/portal/board/board.do?menu_grp=MENU_NEW01&menu_no=2645. Accessed Mar. 16, 2018.
- Mira L, Silva M, Manso CF. 1994. Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem. Pharmacol.* 48: 753-759.
- Ni X, Wang H. 2016. Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease. *Am. J. Transl. Res.* 8:1073-1081.
- Pereira C, Calhelha RC, Barros L, Ferreira ICFR. 2013. Antioxidant properties, anti-hepatocellular carcinoma activity and hepatotoxicity of artichoke, milk thistle and borututu. *Ind. Crop. Prod.* 49:61-65.
- Saller R, Meier R, Brignoli R. 2001. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs* 61:2035-2063.
- Zaulet M, Kevorkian SEM, Dinescu S, Cotoraci C, Suci M, Herman H, Buburuzan L, Badulescu L, Ardelean A, Hermenean A. 2017. Protective effects of silymarin against bisphenol A-induced hepatotoxicity in mouse liver. *Exp. Ther. Med.* 13:821-828.