pISSN 1229-1153 / eISSN 2465-9223 *J. Food Hyg. Saf.*
Vol. 33, No. 2, pp. 124~130 (2018)
https://doi.org/10.13103/JFHS.2018.33.2.124

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

LC-MS/MS를 이용한 건강기능식품 중 실리마린 분석법 연구

오미현 · 이진희 · 김상아 · 김미혜*
경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과

Analytical Method Development for Determination of Silymarin by LC-MS/MS for Related Health Functional Foods

Mihyune Oh, Jin Hee Lee, Sang-A Kim, and Meehye Kim*
Imported Food Analysis Division, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, Ministry of Food and Drug Safety, Incheon, Korea
(Received January 29, 2018/Revised February 8, 2018/Accepted February 26, 2018)

ABSTRACT - The Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) is amending its test methods for the use of health functional foods (dietary food supplement), in order to establish regulatory standards and specifications in Korea. In this regard, we continue to pursue and perform our research on the analytical method development for the items being researched and reviewed. In this study, we have developed a sensitive and selective test method that could simultaneously separate and determinate six major bioactive flavonolignans in silymarin, which are based on the use of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The standard calibration curves presented a linearity effect with the correlation coefficient (r^2) > 0.999. The limits of detection (LODs) and limits of quantitation (LOQs) were in the range of 0.3~9.0 μg/L and 0.8~27.3 μg/L, respectively. The recovery results ranged between 96.2~98.6% at 3 different concentration levels, and its relative standard deviations (RSDs) were less than 5% as noted in this study. The proposed analytical method was characterized with a noted high resolution of the individual silymarin constituents, and the assay was fully validated as well. Our research can provide a significant scientific evidence that can be useful to amend the silymarin test method for the Health Functional Food Code.

Key words : Silymarin, Analytical method, LC-MS/MS, Health functional food

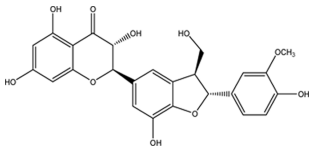
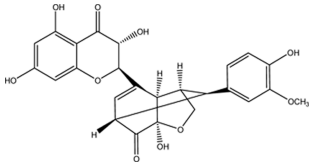
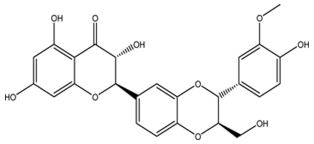
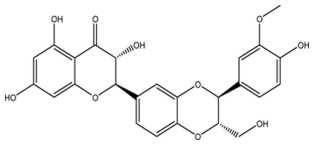
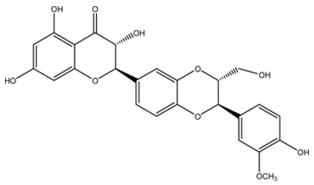
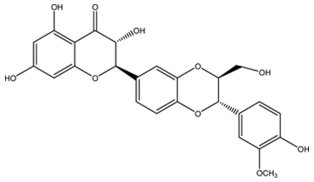
생활수준의 향상으로 만성퇴행성질환인 성인병증가와 고령화사회진입 등에 따라 자기건강관리(Self-Health Care)에 대한 관심이 높아지고 건강기능식품 소비가 급증하였다. 2012년 우리나라 건강기능식품 시장규모는 1.34조원이었으나 2016년 1.95조원으로 46% 증가하였다[1]. 이와 동시에 각종 위해요소도 증가하고 있어 식품의약품안전처(이하 식약처)에서는 우수한 건강기능식품이 제조·공급될 수 있는 환경을 조성하고 삶의 질 향상 등 국민 건강증진을 위한 다양한 정책과 제도를 마련하여 시행하고 있다. 건강기능식품은 우리나라에서는 2004년부터 「건강기능식품에 관한 법률」로 관리되고 있으며, 접근성을 높이기 위하여 현재 28종의 영양소와 인삼 등 기능성원료 67종을 건강기능식품 공전에 수재하였다[2].

*Correspondence to: Meehye Kim, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, 137, Juan-ro Nam-gu Incheon 22133, Korea
Tel: 82-32-450-3360, Fax: 82-32-442-4622,
E-mail: meehkim@korea.kr

실리마린은 국화과에 속하는 마리아엉겅퀴(*Silybum marianun*)의 열매에서 추출한 밀크씨슬(카르두스 마리아누스, *Cardus marianus*) 추출물의 주성분이다. 플라보리그난 계열 화합물들의 복합체이며 실리크리스틴(Silychristin), 실리디아닌(Silydianin), 실리빈A(Silybin A), 실리빈B(Silybin B), 이소실리빈A(Isosilybin A) 및 이소실리빈B(Isosilybin B) 총 6개 물질로 구성되어 있다. 밀크씨슬 추출물은 간 기능 회복 및 세포 보호효과가 있는 것으로 알려져 있고, 약물로서 간질환의 보조요법에 사용되고 있으며 간장질환의 치료를 위해 유럽이나 아시아에서 널리 사용되어 왔다[3-5] (Table 1).

이와 같은 효능으로 밀크씨슬 추출물은 건강기능식품 공전에 수재되어 있으며 그 기능성은 "간 건강에 도움을 줄 수 있음"으로, 일일섭취량은 "실리마린으서 130 mg"으로 기재되어 있다. 기능성분(또는 지표성분)은 실리마린으로 320~660 mg/g 함유되도록 규정되어 있으며, LC-UV법으로 정량하는 시험법이 수재되어 있다[6].

Table 1. Molecular structure of Silychristin, Silydianin, Silybin A, Silybin B, Isosilybin A and Isosilybin B

Compound	Structure	Molecular formula	Molecular weight	CAS number
Silychristin		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	33889-69-9
Silydianin		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	29782-68-1
Silybin A		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	27888-70-6
Silybin B		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	142797-34-0
Isosilybin A		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	142796-21-2
Isosilybin B		$C_{25}H_{22}O_{10}$	482.44	142796-22-3

최근에는 건강기능식품 시장에서 다양한 원료가 혼합된 복합제품 개발이 활발하게 추진되고 있으며, 건강기능식품 품목제조신고 해설서(식약처 발간)에 따르면 정제, 캡슐 과립 등 12개 제형이외 즉석밥 등 일반 식품 형태로 확대되고 있다. 이러한 제품의 경우는 기존의 시험법으로는 분석이 어려운 경우도 있어 이에 적용 가능한 새로운 시험법 개발이 필요하다. 특히 실리마린은 구조가 유사한 6개 성분의 합으로 이루어져 있어 정성・정량에 있어서 특이성 및 검출한계 등이 개선된 분석법 개발이 절실한 실정이다.

현재까지 분석자료를 검토한 결과 James 등[7,11]이 밀크씨슬이 함유된 건강기능식품에서 추출한 실리마린 6종에 대해 LC-MS/MS 동시분석법을, Kuiwu 등[9]은 밀크씨슬 추출물에서 실리마린을 메탄올로 추출하여 LC-MS/MS 분석하였고, Bryan 등[8]은 13명 피험자(남자8명, 여자5명) 대상으로 밀크씨슬을 섭취하도록 한 후 시간에 따른 혈장을 채취하여 실리마린 6종을 질량분석기로 분석한 논문이 보고되었다.

밀크씨슬 추출물은 공정서로서 건강기능식품공전, 대한민국약전, 대한민국약전외한약(생약)규격집, USP 등에 수재되어있으며, 분석법은 공통적으로 시료를 메탄로 추출한 후, 메탄올성 인산용액을 이동상으로 하여 액체크로마토그래프법(HPLC-UV)으로 6개의 실리마린류(실리크리스틴, 실리디아닌, 실리빈A, 실리빈B, 이소실리빈A, 이소실리빈B)를 분리・분석한 후 총합으로 실리마린의 함량을 구하는 방법이며, 질량분석법은 수재되어 있지 않다[1,12-14].

이에 본 연구에서는 복합제품 등에 적용 가능한 실리마린 분석법을 개발 하였으며, 그 결과를 토대로 공전시험법을 개정하여 건강기능식품 품질관리의 효율성 및 신뢰성을 확보하고 국민건강에 이바지하고자 하였다.

Materials and Methods

실험재료

국내에서 건강기능식품으로 유통되고 있는 실리마린제품 17건을 구입하여 검체로 사용하였다. 대상제품은 실리마린기능성 원료를 주원료로 함유하며 그 기능성과 함량을 「건강기능식품 표시기준」에 따라 표기한 것으로 하였다. 회수율시험을 위해서는 제품에 사용되는 캡슐기제(젤라틴, 천연 및 합성색소) 및 부형제(스테아린산마그슘 및 대두레시틴) 등의 영향을 확인하기 위하여 실리마린을 함유하지 않은 건강기능식품으로 이러한 부형제를 함유하는 비타민함유 제품을 선정하고 구입하여 시험에 사용하였다.

표준품 및 시약

실리크리스틴(Silychristin), 실리디아닌(Silydianin), 실리빈A(Silybin A), 실리빈B(Silybin B), 이소실리빈A(Isosilybin A), 이소실리빈B(Isosilybin B)는 각각 Chromadex사(Irvine, CA, USA)에서, 메탄올, 아세토니트릴 등은 Merck사(Whitehous station, USA)로부터, 이동상조제용으로는 HPLC급으로 구입하였다.

분석장비

시험분석을 위해 사용된 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)는 Waters사의 ACQUITY UPLC System이 결합된 QUATTRO MICRO tandem 사중극자 질량분석기를, 분석용 칼럼으로는 Acquity UPLC® BEH C_{18}(100 mm × 2.1 mm (i.d), 1.7 μm)를 사용하였다.

표준원액 및 표준용액의 조제

실리크리스틴, 실리디아닌, 실리빈A, 실리빈B, 이소실리빈A, 이소실리빈B 표준품 약 10 mg을 각각 정밀하게 달아 메탄올 100 mL에 녹여 표준원액으로 하였다. 각각의 실험에서 희석용매(메탄올 : 5 mM 암모늄아세테이트 수용액 = 3 : 7)를 이용하여 표준원액을 적정농도로 단계별 희석한 후 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 표준용액으로 하였다.

시험용액의 조제

균질화한 시료를 실리마린으로서 약 10 mg 해당량을 정밀하게 달아 메탄올 100 mL에 녹이고 이 용액을 희석용매(메탄올 : 5 mM 암모늄아세테이트 수용액 = 3 : 7)로 적절한 농도로 희석한 후 0.2 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 시험용액으로 하였다.

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석조건

질량분석법(LC-MS/MS)을 개발하기 위하여 현재까지 분석자료를 검토한 결과, 칼럼은 모두 C_{18}으로 치환된 역상칼럼을 사용한 것을 확인하였으며 본 시험법에서도 동일한 것을 사용하였다. 검체는 대부분의 문헌에서 메탄올 추출법을 사용하였고 본 시험에서도 메탄올을 추출용매로 사용하였다[7-11]. 분석감도를 증가시키기 위하여 검체를 메탄올로 추출한 후 5 mM 암모늄아세테이트 수용액과 메탄올의 비율를 달리하면서 희석하여 시험하였다. 메탄올과 5 mM 암모늄아세테이트 수용액의 혼합비율을 각각(10 : 90), (20 : 80), (30 : 70), (40 : 60), (50 : 50) 등 다양한 조성에서 비교분석을 하여 최적조건을 확립하였다.

분석문헌 자료 검토[7-11] 및 예비시험을 통하여 이동상은 A, B 두가지 용매를 기울기 용리방식으로 사용하였으며, 이동상 A는 0.1% 개미산이 함유된 5 mM 암모늄아세테이트 수용액, 이동상 B는 0.1% 개미산이 함유된 메탄올을 사용하였다(Table 2).

Table 2. Analytical conditions for the determination of silymarin

Items	Conditions		
Mobile phase	A: 0.1% Formic acid in 5 mM ammonium acetate B: MeOH : Water : Formic acid (95:5:0.1)		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	60	40
	25	35	65
	28	60	40
Flow rate	0.2 mL/min		
Ion mode	ESI, Negative mode		
Inj. vol.	2 μL		
Analysis mode	MRM		
Capillary voltage	2.0 kV		
Source temp.	150°C		
Desolvation temp.	350°C		
Desolvation gas flow	600 L/h		

질량분석기를 이용한 분석은 전자분무이온화법(Electro-Spray Ionization, ESI)으로 음이온 모드(Negative ion mode)에서 수행하였다. 각 6개 실리마린 구성성분의 모분자에서 형성된 딸이온들에 대한 정량이온과 정성이온을 가장 감도가 크고 안정적으로 쪼개지는 이온들을 선정하기 위하여 문헌을 검토하고 예비시험을 실시하였다.

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석법 유효성 검증

LC-MS/MS를 이용한 실리마린(실리크리스틴, 실리디아닌, 실리빈A, 실리빈B, 이소실리빈A, 이소실리빈B) 분석법을 확립하고 유효성을 검증하였다. 직선성(linearity), 검출한계(LOD, limit of detection), 정량한계(LOQ, limit of quantification), 정확도(Accuracy), 정밀도(Precision)등에 대

해 검증하였으며, AOAC 시험법 검증 가이드라인에서 제시하는 방법을 참고하였다[15].

직선성은 실리마린 표준용액 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0 250.0 μg/L을 이용하여 유효성을 검증하였다. 정량한계와 검출한계는 직선선을 구하기 위하여 사용한 검량선을 3회 반복측정하여 기울기의 평균값(S)과 y절편의 표준편차(σ)를 이용하여 구하였다. 검출한계는 3.3 σ/S, 정량한계는 10 σ/S로 산출하였다.

정확도(회수율)를 확인하기 위하여 실리마린을 함유하지 않은 비타민C 제품을 기질바탕시료(matrix blank : 기질 포함, 실리마린 불포함)로 선정하여 회수율을 검토하였다. 기질바탕시료에 실리마린표준용액을 각각 300, 600, 900 μg/L이 되도록 첨가하여 3회 반복 실험을 하였다.

검체량의 변화에 대한 반복 정밀도와 시험실간 정밀도를 확인하기 위하여 검체 0.9 g당 실리마린 130 mg을 함유하는 유통제품을 구입하여 이용하였다. 반복성 시험에서는 실리마린으로서 10 mg, 15 mg, 20 mg에 해당하도록 검체 각각 70 mg, 105 mg, 140 mg을 취하여 5회 반복 측정하였다. 실험실간 정밀도를 확인하기 위하여서는 두 실험실에서 각 5회 반복 측정하였다.

유통·판매되고 있는 실리마린 함유 건강기능식품을 17건을 구입하여 질량분석법에 대한 적용성 시험을 실시하였다.

Results and Discussion

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석조건

검체를 메탄올로 추출한 후 5 mM 암모늄아세테이트 수용액이 함유된 희석용매를 사용하여 단계별 희석하였다. 최적의 분석조건을 선정하기 위하여 메탄올과 5 mM 암모늄아세테이트 수용액의 혼합비율을 각각 10 : 90, 20 : 80, 30 : 70, 40 : 60, 50 : 50 등 다양한 조성에서 비교분석하였다. 10 : 90에서는 물의 함량이 많아 이온화과정에서 이동상이 휘발되지 않고 결국 감도가 현저히 떨어지는 결과를 얻었다. 20 : 80에서는 피크 끌림현상이 있었고, 50 : 50조성에서는 피크가 겹쳐지면서 분리능이 떨어졌고, 30 : 70의 비율로 혼합하였을 때 분리능과 감도 모두 좋은 결과를 나타내었다. 이상의 실험을 통하여 확립한 최적의 분석조건은 Table 2에 나타내었다.

질량분석방법에서는 ESI negative ionization mode를 사용하였고 각 실리마린의 모분자에서 딸이온들에 대한 문헌검토를[10] 통해 정량이온과 정성이온을 선정하였다. 개개의 피크에서 가장 감도가 크고 안정적으로 쪼개지는 이온들을 실리크리스틴의 모분자 $[M-H]^-$ = *m/z* 481 ion에서 *m/z* 325 ion, *m/z* 125 ion으로, 실리디아닌의 모분자 $[M-H]^-$ = *m/z* 481 ion에서 *m/z* 151 ion, *m/z* 125 ion으로 확인되었다. 실리빈A와 실리빈B는 모분자 $[M-H]^-$ = *m/z* 481 ion에서 *m/z* 301 ion, *m/z* 125 ion으로, 이소실리빈A와 이소실리빈B는 모분자 $[M-H]^-$ = *m/z* 481 ion에서 *m/z* 453 ion, *m/z* 125 ion으로 설정하였다(Table 3).

Table 3. Selected-ion of LC-MS/MS for silymarin

Compound	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Silychristin	481	325, 125	41	21, 37
Silydianin	481	151, 125	41	26, 27
Silybin A and B	481	301, 125	41	18, 38
Isosilybin A and B	481	453, 125	41	17, 30

액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS) 분석법 유효성 검증

특이성 및 직선성

특이성을 확인하기 위하여 표준용액과 시험용액에서의 실리마린 각각의 피크에 대하여 분리도 및 머무름 시간을 확인한 결과 동일한 위치에 단일 피크가 측정되었다. Fig 1은 표준용액과 시험용액을 분석한 크로마토그램이며 동일한 위치에 단일 피크를 확인하였다. 그 결과 표준용액과 시험용액에서 지표(기능)성분인 실리마린의 각 피크의 머무름시간이 일치함을 확인할 수 있었다. 또한 각 성분에 대한 직선성(linearity)을 확인하기 위하여 실리마린 각각의 표준용액 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125.0 250.0 μg/L를 LC-MS/MS에 주입하여 분석한 결과 상관계수(r^2)가 모두 0.999 이상으로 나타나 AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준($r^2 > 0.99$)을 만족시켰다[15].

검출한계 및 정량한계

직선선을 구하기 위하여 사용한 검량선을 3회 반복측정하여 기울기의 평균값(S)과 y절편의 표준편차(σ)를 이용하여 구하였다(Fig. 2). 3.3 σ/S를 검출한계(LOD)로 10 σ/S를 정량한계(LOQ)로 산출하였고, 실리크리스틴은 0.3, 0.8, 실리디아닌은 9.0, 27.3, 실리빈A은 3.3, 9.9, 실리빈B는 5.4, 16.3, 이소실리빈A는 4.9, 14.9, 이소실리빈B는 3.2, 9.7 μg/L이었다.

정확도 및 정밀도

정확도를 확인하기 위하여 기질바탕시료에 실리마린을 각각 300, 600, 900 μg/L 첨가하여 3회 반복 실험을 하였다. 그 결과 각각의 농도에서 회수율은 96.2, 97.2, 98.6%로 나타났으며, 상대표준편차는 4.5, 3.8, 1.6%이었다(Table 4).

검체량의 변화에 대한 반복 정밀도를 확인하기 위하여 검체를 각각 70 mg(실리마린으로서 10 mg 해당량), 105 mg (실리마린으로서 15 mg 해당량), 140 mg(실리마린으로서

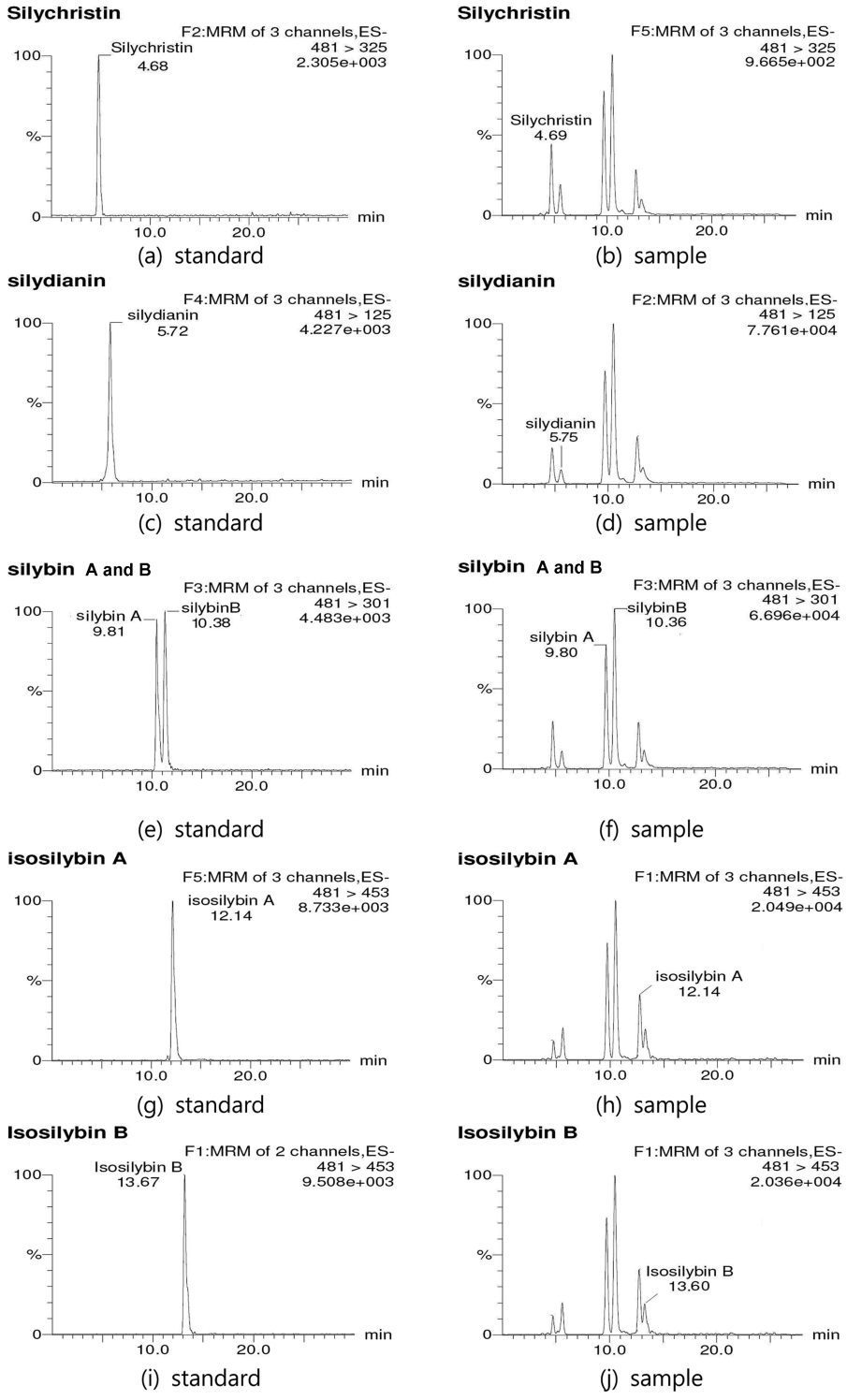


Fig. 1. Representative MRM chromatograms of Silychristine (a, b), Silydianine (c, d), Silybin A and B (e ,f), Isosilybin A (g, h) and Isos lybin B (i, j).

20 mg 해당량)을 취하여 5회 반복 측정하였다. 각 농도의 상대표준편차는 각각 일내 1.5, 3.0, 1.4%이었고 일간에서는 1.5, 1.6, 4.4% 임을 확인하였다(Table 5).

각 분석물에 대한 정확도(회수율) 및 정밀도는 AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준(분석물 농도 1 μg/g일 때 회수율 범위 75~120%, 상대표준편차 8%)에 모두 부합하는 결과로 높은 정확도와 정밀도를 확인할 수 있었다.

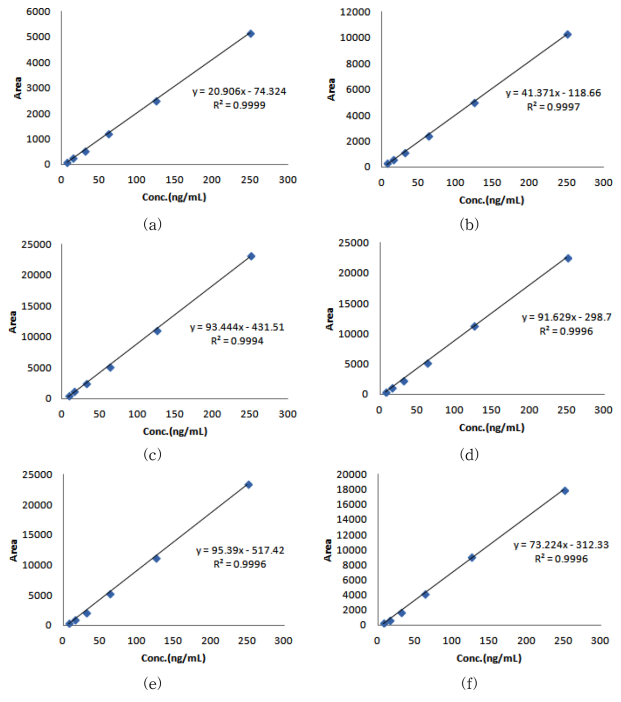


Fig. 2. Calibration curve of Silychristin (a), Silydianin (b), Silybin A (c), Silybin B (d), Isosilybin A (e) and Isosilybin B (f).

Table 4. Validation results (accuracy) of analytical method for the determination of silymarin (n = 5)

Applied concentration (μg/L)	Recovery ± SD (%)	RSD (%)
300	96.2 ± 4.3	4.5
600	97.2 ± 3.7	3.8
900	98.6 ± 1.6	1.6

Table 5. Validation results (repeatability) of analytical method for the determination of silymarin (n = 5)

Sample (mg)	Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)	(Day to Day) Measured mean (mg/g) ± SD, RSD (%)
70	120.9 ± 1.9, 1.5	122.1 ± 1.9, 1.5
105	119.5 ± 3.6, 3.0	119.6 ± 2.0, 1.6
140	122.0 ± 1.8, 1.4	127.3 ± 5.5, 4.4

실험실간 교차검증

분석법의 유효성 확인을 위하여 실험실간 교차검증을 실시하였다. 실리마린분석에 대한 상대표준편차는 2.2%로 나타났으며, AOAC 가이드라인에서 제시하는 기준(분석물 농도 1 μg/g일 때 상대표준편차 16%)에 적합한 결과로서 분석법의 일관성을 확인하였다(Table 6).

유통 건강기능식품에 대한 적용성 검토

실리마린함유 제품에 대하여 확립된 LC-MS/MS 분석법

Table 6. Inter-laboratory validation results (reproducibility) of analytical method for the determination of silymarin (n = 5)

LAB 1	LAB 2	Measured mean (mg/g)	RSD(%)
Measured mean (mg/g) ± RSD(%)	Measured mean (mg/g) ± RSD(%)		
124.6 ± 1.5	120.9 ± 1.5	122.7	2.2

Table 7. The contents of silymarin for commercial products by LC-MS/MS (n = 3)

Products (No)	Silymarin contents (%)	Other compounds
1	88.0	Vitamin B_1, B_2, B_6, Nicotinic acid, Pantothenic acid
2	83.3	-
3	98.6	Vitamin A, B_1, B_2, B_6, B_{12}, Folic acid, Zn
4	86.5	-
5	94.3	Vitamin B_1, B_2, E, Zn, Se
6	103.3	Vitamin B_1, B_2, B_6, Nicotinic acid, Pantothenic acid, Biotin, Zn,Se
7	103.0	Vitamin C
8	90.5	Vitamin B_1, B_2, B_6, Pantothenic acid, Biotin, Folic acid, Se, Cr, Zn, Nicotinic acid
9	106.1	Vitamin B_1, B_2, B_6, Zn
10	82.2	-
11	82.6	Vitamin C
12	81.2	-
13	86.8	Vitamin B_1, B_2, B_6, Pantothenic acid, Nicotinic acid
14	85.6	Zn
15	93.5	Vitamin B_1, B_2,
16	106.5	Vitamin B_1, B_2, B_6, Zn
17	89.7	-

을 이용하여 실리마린 시험을 3반복 실시한 결과, 17건 실리마린 제품은 표시 함량 대비 81.2~106.5%로 현행 기준 80~120%을 만족하여 적합함을 확인하였다(Table 7).

본 연구를 통하여 LC-MS/MS 분석법을 이용하여 건강기능식품 중 정성·정량가능한 실리마린 시험법을 확립하고 시험법 유효성을 검증하였다. 본 시험법을 활용하여 분석의 정확성 및 효율성이 증대되고 건강기능식품 공전개정에 활용될 수 있으며, 원료 및 제품의 품질관리에 대한 신뢰성을 확보할 수 있으리라 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처 연구개발사업의

연구비 지원(17161미래식057)에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

건강기능식품의 경우 단성분보다는 복합제품 개발이 우선시되고, 12가지 기본제형이외에도 즉석밥과 같은 일반식품형태의 제품으로 범위가 확대되고 있다. 이러한 제품에서 기능성(지표)성분을 효율적으로 분석할 수 있는 방법에 대한 연구가 필요한 실정이다. 복합제품 등에서 정성・정량 가능한 밀크씨슬 추출물의 기능성(지표)성분인 실리마린을 효과적으로 분석할 수 방법을 확립하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 액체크로마토그래프-질량분석기(LC-MS/MS)를 이용하여 신속하고 효율적으로 실리마린의 6가지 구성성분, 실리크리스틴, 실리디아닌, 실리빈A, 실리빈B, 이소실리빈A, 이소실리빈B를 동시분석할 수 있는 정성・정량시험법을 확립하였다. 확립된 시험법에 대해 특이성, 검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도에 대한 검증을 통하여 유효성을 확인하였다. 또한 시중 유통검체 17건을 확보하여 시험한 적용가능성도 검토하였다. 직선성에서는 $r^2 > 0.999$ 이상임을 확인하였고, 검출한계 및 정량한계는 각각 실리크리스틴은 0.3, 0.8, 실리디아닌은 9.0, 27.3, 실리빈A은 3.3, 9.9, 실리빈B는 5.4, 16.3, 이소실리빈A는 4.9, 14.9, 이소실리빈B는 3.2, 9.7 μg/L이었다. 또한 평균 회수율은 96.2~98.6%로 나타났으며, 반복정밀도는 상대표준편차 3%이하, 실험실간 재현성은 1.5%이하로 나타나 정확성, 재현성이 우수하였으며 이는 AOAC 가이드라인[15]에서 제시한 기준에 모두 적합한 수준이었다. 시중 유통품에 대하여 실험한 결과 81.2~106.5%로 모두 적합하였다. 따라서 본 연구에서 개발된 분석법은 건강기능식품 중 실리마린의 정성・정량분석에 이용될 수 있으며, 나아가 건강기능식품 공전 개정에 반영되어 우수한 품질의 건강기능식품유통에 기여할 것으로 판단된다.

References

1. 2017 Food & Drug Statistical Yearbook, 41, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) (2017).
2. Health Fuctional Food Code, 80~174, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice (2016).
3. E. M. Martinelli, P. Morazzoni, S. Liviio and E. Uberti, Liquid chromatographic assay of silybin in human plasma and urine, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 1285-1296 (1991).
4. N. Skottova and V. Krecman, Silymarin as a potential hypocholesterolaemic drug, *Physiol. Res*., **47**, 1(1998).
5. A. Pietrangelo, F. Borella, G. Casalgrandi, G. Montosi, D. Ceccarelli, D. Gallesi, F. Giovannini, A. Gasparetto, and A. Masini, Antioxidant activity of silybin in vivo during long-term iron overload in rats, *Gastroenterology,* **109**, 1941 (1995).
6. Health Fuctional Food Code, 100~101, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice 2016-143 (2016).
7. James I. L, Bih H. H, Di W, Jeffrey S. B, Separation and characterization of silybin, isosilybin, silydianin and silychristin in milk thistle extract by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. chromatography A.* **1116**, 57-68 (2006).
8. Bryan J.B, Had-Jie Z, John S.M, A sensitive LC-MS/MS assay for the simultaneous analysis of the major active components of silymarin in human plasma. *J. Chromatography B*. **902**, 1-9 (2012).
9. Kuiwu W, Hong Z, Lianqing S, Qizhen D, Jianrong L, Rapid separation and characterization of active flavonolignans of *Silybum marianum* by ultra-performance liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry. *J. Pharmaceutical and biomedical Anal.* **53**, 1053-1057 (2010).
10. Zhiming W, Todd E. D, Sarah J. S, Roy L. H, Michael W. F, Philip C. S, Pharmacokinetics and Metabolic profile of Free, Conjugated, and Total Silymarin Flavonolignans in Human Plasma after Oral administration of Milk Thistle Extract. *Drug Metabolism and disposition.* **36**(1), 65-72 (2008).
11. James I. L, Mahesh N, Jeffrey S. B, Analysis and comparison of active constituents in commercial standarized silymarin extracts by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. chromatography B.* **845**, 95-103 (2007).
12. Health Fuctional Food Code (Test method), 398~401, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice 2016-143 (2016).
13. Korean Pharmacopoeia, 490~491, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice 2017-21 (2017).
14. Korean Herbal Pharmacopoeia, 171~177, Ministry of Food and Drug Safety (MFDS) Notice 2017-11 (2017).
15. AOAC INTERNATIONAL: Guidelines for Dietary Supplements and Botanicals, AOAC Official methods of analysis (2013).