J. Fd Hyg. Safety 18(4), 195–201 (2003)

식품중 불법함유된 발기부전치료제 성분 검출을 위한 동시분석법 연구

장재희 · 박건상 · 박혜경 · 구용의 · 최윤주 · 황인경* · 김대병†
*식품의약품안전청, *서울대학교*

Simultaneous Identification/Determination System for Sildenafil, Homosildenafil, Vardenafil and Tadalafil as Adulterants in Foods

Jaehee Jang, Kunsang Park, Hyekyung Park, Yongeui Koo, Younju Choi, InKyung Hwang*, and Daibyung Kim†
*Korea Food and Drug Administration, *Seoul National University*

ABASTRACT – An easily available, simultaneous identification/determination procedure for sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil in adulterated health related foods was established by using a combination of three different analytical methods; thin layer chromatography (TLC), liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) and high-performance liquid chromatography (HPLC)/photo-diode-array detector. The sample solution for TLC was applied to silica gel 60 F_{254} plates with ethylacetate/acetonitrile/25%ammonia (90:10:5) as a developing solvent. Spots were located under UV radiation at 254 nm and dragendolf's reagent. Mass spectra of the compounds by LC/MS were investigated with electrospray ionization (ESI) interface, under positive ion mode. The HPLC analysis was performed on a column of capcell pak C_{18} (UG120, 4.6×250 mm I.D. 5 μm) with 0.1% sodium 1-hexansulfonate (in 0.1% phosphoric acid)/acetonitrile (73:27) as a mobile phase, and effluent was monitored with a photo-diode-array detector. Quantitative HPLC analysis of the compounds were detected at 291 nm. When this procedure was applied to commercial foods, Sildenafil content was in the range of 0.4 mg/g~360.9 mg/g from 7 out of 35 samples. Homosildenafil content was in the range of 2.2 mg/g~336.0 mg/g from 7 out of 35 samples. Tadalafil content was 429.3 mg/g, 9.6 mg/500 mg from 2 out of 35 samples. The procedure described here is available for the screening of sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil.

Key words: sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenarfil, TLC, LC/MS, HPLC/PDA, health related food

건강에 대한 관심이 높아지면서 건강의 유지와 증진에 효과가 있거나 그렇게 기대되는 건강관련식품의 소비가 증가하고 있다.[1,2] 그러나 이러한 제품들 중에는 그 효과를 높이기 위하여 식품에 사용이 금지된 약효가 강한 성분을 첨가한 것도 있으며, 이를 섭취한 소비자가 부작용을 일으키기도 한다. 미국의 경우 아시아 약용식물에 대한 불법 약물 혼입 여부를 조사[3]한 바 있으며, 일본에서도 음료중에 불법 첨가된 발기부전치료제 성분인 sildenafil과 phentolamine을 검출하여 보고[4]하였다. 그러나 우리나라에서는 지금까지 식품 중 위해성분, 즉 의약품과 같은 단기적이고 효과적인 기능성을 목적으로 식품에 불법적으로 첨가하는 성분 분석에 대한 구체적이고 체계적인 연구가 수행되지 않았다.

본 연구에서는 국내에서 유통되는 건강관련식품 중 성기능 개선 및 효과에 대하여 광고하고 판매하고 있는 제품에 의약품성분인 발기부전치료제 성분을 불법 첨가한다는 정보에 따라 유통식품중의 위해성분의 함유실태를 파악하기 위하여, 최근 발기부전치료제로 의약품의 유효성분인 sildenafil("viagra"의 유효성분), tadalafil("cialis"의 유효성분), vardenafil("levitra"의 유효성분) 및 sildenafil의 유사물질인 homosildenafil[5](Fig. 1)을 대상성분으로 선정하고, 이들 성분의 정성과 정량을 위한 동시분석법을 개발하고 불법함유된 유통 제품 중의 함량을 분석하여 함유 실태를 파악하고자 하였다.

본 연구의 건강관련식품은 유용성표시가 허용되는 건강보조식품, 특수영양식품, 인삼제품류와 식품공전상 건강보조식품, 특수영양식품, 인삼제품류에 해당되지는 않지만, 건강에 유익한 효과를 가지고 있다고 광고하며 판매하거나 소비자가 그렇게 인식하고 있는 기타 식품류를 포함하였다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

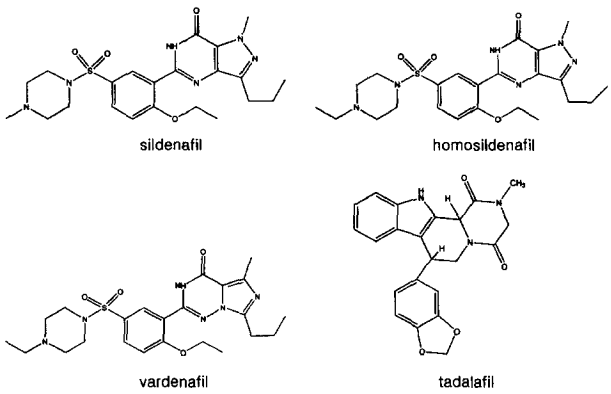

Fig. 1. Chemical Structures of sildenafil (1-[[3-(6,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine), $C_{22}H_{30}N_6O4_S$, 474.58), homosildenafil (1-[[3-(4,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo [4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-rthoxyphenyl]4-ethylpiperazine, $C_{23}H_{33}N_6O_4S$, 489.23), vardenafil (1-[[3-(3,4-dihydro-5-methyl-4-oxo-7-propylimidazo[5,1-f]-as-triazin-2-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-ethylpiperazine, $C_{23}H_{32}N_6O_4S$, 488.62) and tadalafil((6R,12aR)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methyl-6-(3,4-methylenedioxyphenyl)-pyrazino [2',1':6,1]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione, $C_{22}H_{19}N_3O_4$, 389.14).

재료 및 방법

실험재료

시중에서 유통되고 있는 성기능개선을 광고하고 있는 건강관련식품 35종을 대상으로 하였다. 대상식품의 식품유형은 건강보조식품 2종, 특수영양식품 6종, 인삼제품류 13종, 음료류 8종, 기타식품류 6종, 주류 2종이었다.

분석기기

HPLC-PDA는 Nano space SI-2(Shiseido, Japan), LC/MS-MS는 LCQ DECA(Finigan, Germany)를 사용하였다.

표준품 및 시약

Sildenafil은 한국화이자가 제공한 sildenafil citrate(69.4%)를, vardenafil(99.8%)은 한국바이엘, tadalafil(99.9%)은 한국릴리, homosidenafil(99.9%)은 동아제약에서 제공한 표준품을 사용하였다. Methanol, acetonitrile은 Merck(Germany)사의 HPLC용, sodium 1-hexanesulfonate는 TCI-Ace(Japan)사 제품을, phosphoric acid는 wako(Japan)사 제품을 구입하여 사용하였다.

시험용액의 조제

액체 시료는 약 1 m*l*을 정확히 취하여 methantol을 사용하여 50 m*l*로 희석하고 0.45 μm membrane filter로 여과한 후 사용하였고, 고체시료는 균질하게 분쇄한 후 약 1.0 g을 정확히 취하여 소량의 methanol을 가하여 초음파진탕기로 추출한 후, 액체 시료와 같은 방법으로 시험용액을 조제하였다.

박층크로마토그래피 조건

표준용액과 시험용액 10 μL를 Silica Gel 박층판(60 F_{254})에 점적하고 건조시킨 후 ethylacetate/acetonitrile/ammonia (90:10:5) 용액으로 전개시켰다. 전개 후 UV 254 nm에서 흡수반점을 확인하고, Dragendorff's reagent를 고르게 분사하여 발색을 확인하였다.

HPLC/MS 조건

LC/MS 확인 분석에서 칼럼은 C_{18}(2.0×250 mm I.D. 5 μm, Shiseido, Japan), 이동상은 물과 95% acetonitril을 사용하여 Table 1의 조건으로 mass range 50~500 amu에서 분석, 확인하였다.

HPLC/PDA 조건

HPLC/PDA분석은 capcell pak C_{18}(UG120, 4.6×250 mm I.D. 5 μm, Shiseido, Japan) 칼럼을 사용하고, 이동상은 0.1% sodium 1-hexanesulfonate용액에 phosphoric acid를 0.1%가 되게 혼합한 액과 acetonitrile을 73:27(v/v)이 되도록 제조하였으며 유속 1 mL/min에서 표준용액과 시험용액을 10 μL 주입하여 190~400 nm에서 PDA 검출기로 spectrum 형태를 확인하였으며, UV 291 nm에서 정량하였다.

Table 1. Operating conditions of LC/MS-MS for sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil

Column	C_{18} (2.0×250 I.D. 5 μm)	
Mobile phase	Pump A	Water
	Pump B	95% acetonitril
Flow rate	1mL/min	
Pump gradient program		
Time(min)	Pump A(% v/v)	Pump A(% v/v)
0.0	98	2
10.0	98	2
20.0	91	9
25.0	91	9
25.1	98	2
30.0	98	2

결과 및 고찰

박층크로마토그래피에 의한 정성분석

박층크로마토그래피를 이용한 정성분석은 간단하고, 신속하며, 경제적이기 때문에 전세계적으로 널리 쓰이고 있는 방법이다.[3] Sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil은 모두 methanol에 잘 용해되므로, methanol로 추출하였으며, 네 가지 성분을 최적으로 분리하기 위하여 용매의 비율을 조정하여 ethylacetate/acetonitrile/25% ammonia(90:10:5)의 전개용매로 전개하였다. 전개 후 UV 254 nm에서 푸른색의 둥근 반점을 관찰할 수 있었으며(Fig. 2), dragendorf's 발색시약을 분무하면 주황색의 반점을 나타내었다. 박층크로마토그래피는 신속하고 간단하게 발기부전치료제 성분 함유여부를 확인할 수 있으므로, 불법성분의 함유여부를 확인하기 위한 사전검사의 방법으로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

ESI-LC/MS에 의한 의한 정성분석

LC/MS는 시료처리시간과 분석시간이 짧고, 분자량을 근거로 분석물질을 확인하는 것이 매우 선택성이 높기 때문에 신속하고 정확하게 분석물질의 분자량을 측정할 수 있다. 본 연구에서는 건강관련식품중의 sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil의 분자량 피크 확인을 위하여 양이온 모드에서 ESI interface를 사용하여 분석하였다. 2개의 이동상을 사용하여 네 가지 성분을 분리하여 분석하였으며, sildenafil의 protonated molecule은 m/z 475.3(9.27 min), homosildenafil은 m/z 489.3(10.34 min), tadalafil은 m/z 390.1 (7.92 min), vardenafil은 m/z 489.4(9.41 min)이었다(Fig. 3).

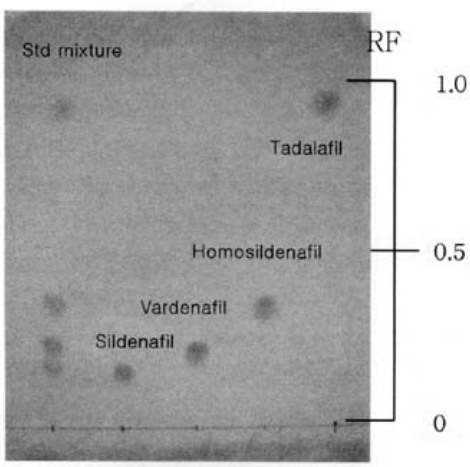

Fig. 2. Thin layer chromatograms of sildenafil, homosildenafil, vardenafil, tadalafil standards.
The plate was developed with ethylacetate/acetonitrile/ammonia (90:10:5) and examined under UV at 254.

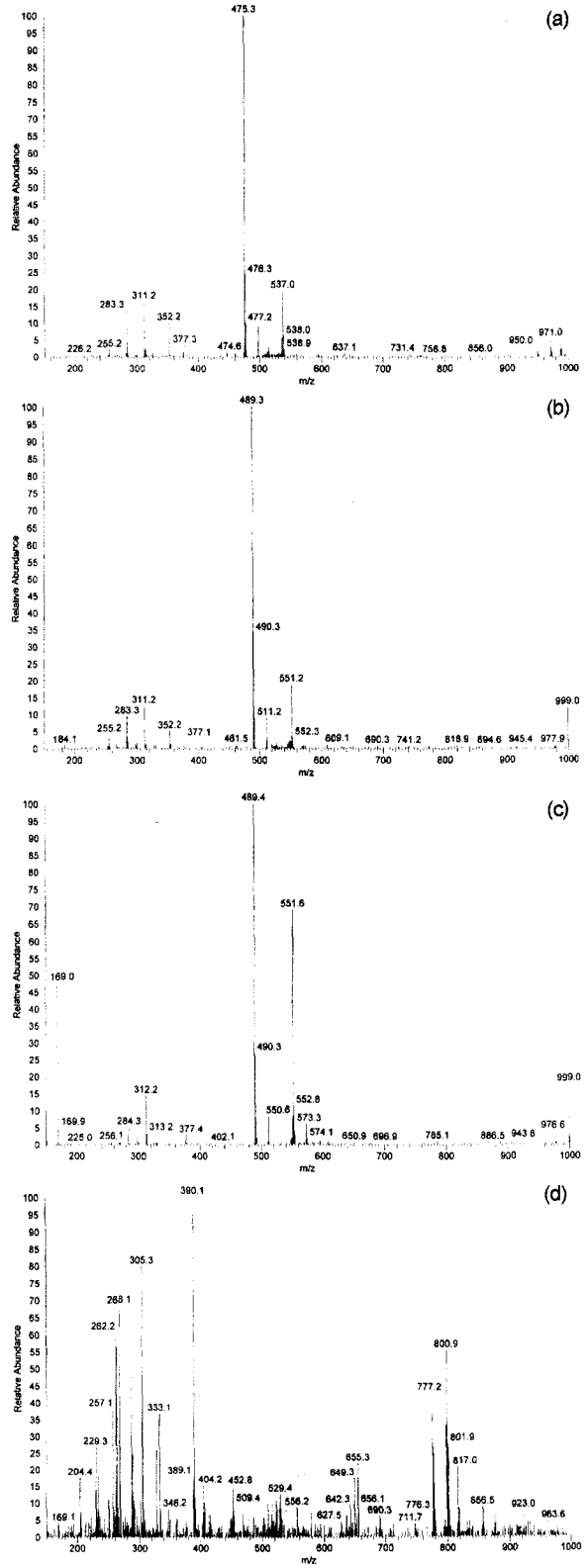

Fig. 3. LC/MS spectra of sildenafil (a), homosildenafil (b), vardenafil (c) tadalafil (d).

시료중의 sildenafil, homosildenafil, tadalafil, vardenafil의 함유가 의심스러운 경우 분자량과 LC/MS 스펙트럼으로 위해성분의 함유를 재확인 하였다.

HPLC/PDA에 의한 정성 및 정량분석

Photo-diod array 검출기는 성분의 일정 파장 범위내에서의 흡광도 패턴을 읽을 수 있는 검출기로서 물질마다 특이한 흡수패턴을 가지고 있기 때문에 각 성분의 흡광도 패턴을 이용하여 정성분석이 가능하며 최대 흡수를 가지는 파장에서의 흡광도를 이용하여 정량분석이 가능한 장점을 가지고 있다. Sildenafil, vardenafil 등의 단일성분 분석법은 HPLC 분석법 등 몇 가지 연구[6-8]가 보고되고 있으나, 식품에 불법혼입 가능성이 있는 유사성분을 동시에 검출하기 위한 동시분석법은 보고된 바 없다. 본 연구에서는 지금까지 보고된 방법을 토대로 분석조건을 최적화하였으며, 0.1% sodium 1-hexanesulfonate용액에 phosphoric acid를 0.1%가 되게 혼합한 액과 acetonitril을 73:27(v/v)로 혼합하여 피크의 감도와 분리능을 조정하였다. 분석결과, vardenafil (6.74 min)이 가장 빨리 가장 빨리 검출되었으며, sildenafil (18.55 min), homosildenafil(20.96 min), tadalafil(31.38 min)의 순서로 검출되었고 총 분석시간은 약 40분이 소요되었다 (Fig. 4). 각 성분의 표준품 및 검출된 시료의 UV 스펙트럼은 Fig. 5와 같다. Sildenafil과 homosildenafil은 methyl group을 제외하고는 동일한 구조를 가지고 있기 때문에 PDA spectrum 패턴이 매우 유사하였으며, 머무름 시간이 다른 것으로서 다른 물질임을 확인할 수 있었다. Sildenafil, homosildenafil, vardenafil, tadalafil 모두 최대 흡수파장은 210 nm 부근이었으나, 선택성이 낮기 때문에 공통적 흡수를 가지는 291 nm에서 정량분석하였다.

각 성분의 검량선은 5~100 ppm에서 좋은 직선성을 가졌으며, 상관계수는 네 성분 모두 0.999 이상이었다. 기기의 검출감도는 signal to noise 비율을 3으로 했을 때 1.0 μg/mL으로서 건강관련식품에 불법으로 첨가하는 성분을 분석하기에 적합하였다.

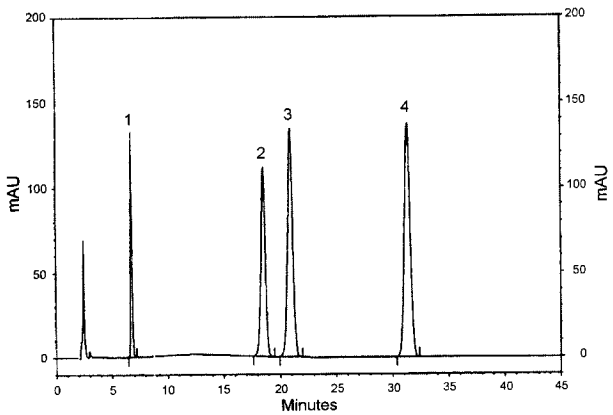

Fig. 4. Chromatogram of standard mixtures of sildenafil, homosildenafil, vardenafil and tadalafil.
Peak identities : 1. vardenafil (6.74 min, 50 μg/ml), 2. sildenafil (18.55 min, 50 μg/ml); 3. homosildenafil (20.96 min, 50 μg/ml); 4. tadalafil (31.38 min, 50 μg/ml).

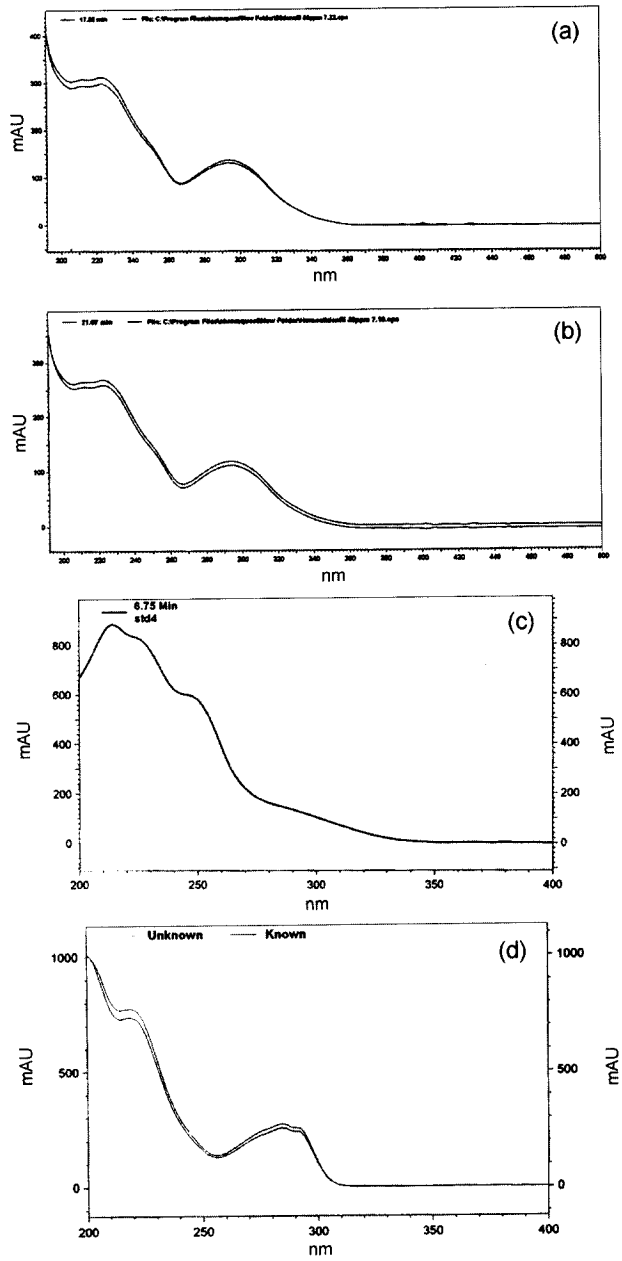

Fig. 5. UV spectra of sildenafil standard and sample no. 18 (a), homosildenafil and sample no. 3 (b), vardenafil (c) tadalafil and sample no. 32 (d).

Table 2. Contents of sildenafil, homosildenafil, tadalafil and vardenafil in sample

No.	Food Type	Dtected chemical	Concentration	
			mg/g	mg/serving
1	Extract product	Homosildenafil	2.2	66.8 mg/30 mL
2	Extract product	N.D.	–	–
3	Extract product	Homosildenafil	5.1	153.0 mg/30 mL
4	Extract product	N.D.	–	–
5	Extract tea	N.D.	–	–
6	Extract tea	N.D.	–	–
7	Ginseng beverages	Sildenafil	0.8	41.9 mg/50 mL
8	Ginseng beverages	N.D.	–	–
9	Ginseng capsules	N.D.	–	–
10	Ginseng capsules	Homosildenafil	336	168.0 mg/500 mg
11	Ginseng capsules	Tadalafil	19.2	9.6 mg/500 mg
12	Ginseng capsules	Sildenafil	82.2	41.1 mg/500 mg
13	Ginseng capsules	Sildenafil	13.8	138.3 mg/10 mL
14	Liqueur	Sildenafil	0.8	83.1 mg/100 mL
15	Liqueur	Sildenafil	0.4	20.5 mg/50 mL
16	Miscellaneous beverages	N.D.	–	–
17	Miscellaneous beverages	N.D.	–	–
18	Nutrient supplement product	Sildenafil	360.9	83.0 mg/230 mg
19	Nutrient supplement product	Homosildenafil	274.4	137.2 mg/500 mg
20	Nutrient supplement product	N.D.	–	–
21	Nutrient supplement product	N.D.	–	–
22	Nutrient supplement product	N.D.	–	–
23	Nutrient supplement product	N.D.	–	–
24	Bee pollen products	N.D.	–	–
25	Red ginseng beverages	N.D.	–	–
26	Red ginseng beverages	N.D.	–	–
27	Red ginseng products	N.D.	–	–
28	Red ginseng products	Sildenafil	202.5	81.0 mg/400 mg
29	Soft-shelled turtle products	N.D	–	–
30	Other products	N.D.	–	–
31	Other products	N.D.	–	–
32	Other products	Tadalafil	429.3	42.9 mg/100 mg
33	Other products	Homosildenafil	11.0	11.0 mg/mL
34	Other products	Homosildenafil	12.9	129.9 mg/10 mL
35	Other products	Homosildenafil	225.0	90.0 mg/400 mg

건강관련식품의 발기부전치료제 성분의 분석결과

성기능개선을 과대 광고하고 있는 유통 건강관련식품 35종에 대하여 본 연구에서 개발한 HPLC/PDA 동시분석법으로 정량 분석한 결과, sildenafil이 7개, homosildenafil이 7개, tadalafil이 2개의 시료에서 검출되었고, vardenafil은 검출되지 않았으며, 검출량은 Table 2와 같다. 발기부전제 성분이 검출된 시료는 LC/MS로 분자량을 재확인 하였다.

검출된 함량은 최저 0.4 mg/g에서 최고 429.3 mg/g으로 분석되었으며, 고함량으로 첨가되어 있는 것은 중국산 원료로서 이러한 원료를 수입하여 국내에서 제조하여 판매하려고 했던 것으로 판단된다(sample 32). Sildenafil의 경우 의약품으로 섭취할 경우 1회에 25 mg을 복용하도록 되어 있는데 본 연구에서 검출된 제품 대부분이 1회 섭취량당 함량이 25 mg 이상으로서 이는 의약품적인 효과가 나타날 뿐 아니라 섭취에 따른 부작용 또한 크게 우려되는 수준이었다.

Sildenafil은 1998년 FDA에서 발기부전 치료제로 승인받은 의약품인 비아그라[9]의 유효성분으로 의사의 처방에 따라 약국에서 구입해야 하지만 이러한 성분을 불법 첨가한 식품은 구입이 간편하여 불법유통이 성행하고 있다. Vardenafil의 약리작용은 sildenafil과 같으나 안구 청색증을 유발하지 않으며 심혈관계 부작용도 없는 것으로 보고되고 있다.[10,11] Tadalafil 또한 sildenafil과 같은 약리작용을 보이고, 폭넓은 환자에게 쓸 수 있으며, sildenafil이나 vardenafil의 경우 약효를 기대하기 어려운 당뇨성 발기부전증에도 효과가 있는

것으로 알려져 있다.[12] 그러나 이러한 sildenafil류는 PDE 5 inhibitor로서 모두 같은 약리작용을 가지기 때문에 장기간 섭취하게 되면 두통, 홍조, 소화불량, 설사와 같은 경미한 증상에서부터 심장병환자들 경우 사망에 이르는 심각한 부작용을 나타내는 것으로 보고되고 있다.[8,13] 특히 sildenafil의 경우에는 안과 질환자가 복용시 어지럼증, 청색증, 야외 눈부심 등의 안과적 문제점이 발생한다고 보고되고 있다.[13]

Homosildenafil은 sildenafil의 methylpiperazine에 methylene기를 추가되어 ethylpiperazine으로 합성된 물질로서, 일반적으로 어떤 물질에 탄소가 하나 더 붙어 있는 물질을 명명할 때 homo-라는 용어를 사용하고 있어 homosildenafil로 명명한 sildenafil 유사체[5]이며, 화학물질 합성이 용이한 중국에서 합성해서 국외로 수출하고 있는 것으로 사료된다.

지금까지 살펴본 바와 같이 현재 국내·외에 시판되는 건강관련식품 중 의약품적인 효능.효과 등을 광고하는 제품들은 그 효과를 위하여 인체에 심각한 부작용을 나타낼 수 있는 의약품성분을 무분별하게 첨가는 것으로 확인되었으며, 이러한 제품들은 국민건강에 위해를 줄 우려가 있다. 따라서 앞으로도 발기부전치료제 성분 뿐 아니라 불법 첨가할 가능성이 있는 위해성분의 데이터베이스를 구축하고 해당 성분의 분석법개발 및 모니터링이 지속적으로 이루어져야 할 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 연구를 위하여 homosildenafil 표준품을 합성하여 주신 동아제약에 감사드립니다.

국문요약

본 연구에서는 국내·외에서 유통되는 건강관련식품 중 성기능 개선 및 효과에 대하여 광고·판매하고 있는 제품들에 대하여 최근 의약품으로 허가된 발기부전치료제인 sildenafil, vardenafil, tadalafil 및 sildenafil의 유사물질인 homosildenafil을 대상으로 정성과 정량을 위한 동시분석법을 개발하고 유통 제품 중의 함량을 분석하여 함유 실태를 파악하고자 하였다. 네 가지 성분을 확인할 수 있는 TLC와 LC/MS 분석방법을 개발하였으며, LC/PDA를 사용한 동시 정량분석법을 개발하고, 건강보조식품 등 건강관련 식품중 sildenafil 등 4종 물질에 대해 총 35개의 시료를 분석한 결과 sildenafil이 7종에서 0.4 mg/g~360.9 mg/g, homosildenafil이 7종에서 2.2 mg/g~336.0 mg/g, tadalafid이 2종에서 각각 19.2 mg/g, 429.3 mg/g로 검출되었으며, 본 연구에서 개발한 동시분석법은 유통식품에 적용 가능하였다.

참고문헌

1. Song, I.S., Kim, C.M., Kim, D.B., Park, H.K., Park, K.S., Koo, Y.E., Choi, Y.J., Jang, J.H., Kim, B.Y., Kim, J.J.: The study on the establishment of framework for the regulatory system of functional foods. Korea Food and Drug Administration, Seoul, pp. 137-158 (2002).
2. 2000 The Study on the trend of New Technology - Functional foods, Korean Intellectual Property Office, Seoul, pp. 201-240 (2000).
3. Compendium of Asian Patent Medicines. California, California Departmenet of Health Services, California (1999).
4. Eiichi Mikami, Tsutomu Ohno and Hiroshi Matsumoto: Simultaneous indentification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising robornat nutrition, Forensic Science International, **130**, 140-146 (2002).
5. Shin, M.-H., Hong, M.-K., Kim, W.-S., Lee, Y.-J., Jeoung, Y.-C.: Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction, *Food Additieves & Contaminants*, **20**(9), 793-796 (2003).
6. Daraghmeh, N. *et al.*: Determination of sildenafil citrate and related substances in the commercial products and tablet dosage form using HPLC, *J. of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 483-492 (2001).
7. Korean Pharmacopoeia (7th ed). Ministry of health and welfare, Seoul (2000).
8. Takako Moriyasu *et al.*: Identification system for sildenafil in health foods, Japan Yakugaku zasshi, **121**(10), 765-769 (2001).
9. United State Patent: Patent Number 5,250,534,1997.
10. Prickaerts *et al.*: Effects of two selective phosphodiesterase type 5 inhibiter sidenafil and vardenafil, on object recognition

memory and hippocampal cyclic GMP level, *Neuroscience*, **113**(2), 351-361 (2002).
11. Noel, N. Kim *et al.*: Inhibition of cyclic GMP hydrolysis in human corpus cavernosum smooth muscle cells by vardenafil, a novel, selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, *Life Sciences*, **69**, 300-304 (2002).
12. Eardley, I. *et al.*: Cialis for men with erectile dysfunction, *International Journal of Clinical Practics*, **56**, 300-304 (2002).
13. Alan M. Laties, Eberhart zrenner: Viagra and ophthalmology. *Progress in Retinal and Eye Research*, **21**, 485-506 (2002).