식품 중의 발기부전치료제 및 유사물질 모니터링

이현숙 · 이준구 · 김진철 · 오재호 · 장영미 · 김미혜^{1*}

경인지방식품의약품안전청 수입식품분석과, ¹식품의약품안전청 오염물질과

Monitoring of Anti-impotence Drugs and Their Analogues in Food

Hyunsook Lee, Joongoo Lee, Jinchul Kim, Jaeho Oh, Youngmi Jang, and Meehye Kim^{1*}

Imported Food Analysis Division, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration

¹Food Contaminants Division, Korea Food and Drug Administration

Abstract This study was conducted to monitor the concentrations of 24 anti-impotence drugs and their analogues in various foods and dietary supplements, with the aim of ensuring the safety of the foods and supplements. The measurements were done in 226 samples using high performance liquid chromatography/photodiode array detector (HPLC/PDA) and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). Five male sexual function enhancing products have been detected as follows: acethylvaridenafil (21,476 mg/kg; 15 mg/capsule from one sample), sildenafil (52,778 mg/kg, 29 mg/capsule in one sample; 71,535 mg/kg, 48 mg/capsule in one sample), and tadalafil (9,772-55,545 mg/kg, 6-33 mg/capsule in four samples). A sustainable monitoring of anti-impotence drugs and their analogues in various foods and dietary supplement is recommended.

Keywords: anti-impotence drugs, monitoring, food, HPLC/PDA, LC-ESI-MS/MS

서 론

발기부전치료제인 sildenafil(비아그라)의 개발은 우연한 기회에 이루어 졌는데 협심증이나 심장병 환자에게 심장근육에 필요한 혈액공급을 원활하게 하기 위한 약제를 개발 하던 중 UK-92-480이라는 코드명을 가진 물질이 심장기능을 회복시키는 기능은 미미한 반면에 부작용으로 음경발기를 일으키는 것을 우연히 발견하여 개발되었고 vardenafil(레비트라) 및 tadalafil(시알리스)도 발기부전치료제로 개발되어 시판 중에 있다(1).

발기부전치료제의 작용 및 기전은 발기조직에 존재하는 PDE 5 (phosphodiesterase type-5)라 불리는 효소의 저해제로서 작용하는 것이다. 발기 즉, 음경해면체의 평활근 이완을 일으키는 평활근 세포내 2차 전령물질인 cGMP(cyclic guanosine monophosphate)와 cAMP(cyclic adenosine monophosphate)는 phosphodiesterase(PDE)라는 효소에 의하여 가수분해됨으로써 비활성화 된다. PDE는 약 10여종이 인체내에 존재하는데, 음경해면체에 주로 분포하는 2,3,5형 PDE 중에서 특히 제5형 PDE는 cGMP에 특이하게 반응하여 음경의 발기에 주로 관여하는 것으로 알려져 있다. Sildenafil은 PDE-5를 선택적, 경쟁적으로 억제함으로써 음경내 cGMP의 양을 증가시켜 발기를 유발하게 된다(1,2). Sildenafil은 두통, 안면홍조, 메스꺼움 등 부작용이 발현할 수 있고, 질산염 제제 복용환자는

절대로 복용해서는 안되며, 또한 발기부전이 심장질환, 당뇨병, 암질환 등에 의해 나타날 수 있으므로 복용에 앞서 원인을 검사, 파악한 후 반드시 의사의 지시를 따라야 한다(2,3). 비아그라의 부작용으로는 두통, 안면홍조, 소화불량, 색조이상, 시야흐림, 비출혈 등이 나타날 수 있으며, 드물지만 기존의 혈관성 망막질환이나 심장질환의 악화도 보고되어 있다(2). 허혈성 관상동맥질환으로 nitroglycerine이나 nitrate를 복용 중인 환자는 절대 금기해야 하며, 이들 약제를 복용하고 있지 않지만 최근 6개월 이내에 뇌졸중이나 심근경색증, 심부전, 불안정 협심증, 생명을 위협하는 부정맥을 포함하여 심각한 심혈관계 질환을 앓은 환자와 중증의 간기능장애 환자는 고위험군에 속하므로 충분한 임상적 평가가 선행되어야 한다(2).

발기부전치료제로 사용되는 sildenafil류 등은 의사의 처방에 의해 사용될 수 있는 전문의약품이나 최근 발기부전치료제에 대한 효능이 알려진 후 건강기능식품 및 식품에 안전성이 입증되지 않은 화학적 합성품의 혼입 사례가 증가하고 있고 수입 또는 국내 유통 식품 중에는 효능을 가진 의약품 성분 또는 불법 합성한 화학물질을 첨가하여 판매되는 사례가 증가하고 있어 국민의 건강을 위협하고 있다(1). 발기부전치료제는 수요는 많은데 전문의약품으로서 취급되기 때문에 일반인들의 접근이 쉽지 않다. 수요는 많은데 의약품으로서 구입하여 사용하기 어려운 상황이 발기부전치료제 성분이 함유된 불법제품이 시중에 범람하게 된 큰 이유이다(4). 발기부전치료제의 경우 의사로부터 처방을 받지 않고 무분별하게 오남용 할 경우 심장마비, 안면홍조 등의 부작용(2)이 심각하고, 발기부전치료제 및 그 유사물질의 혼입 여부의 정보가 없는 상태에서 이성분이 들어 있는지 모르는 상태에서 섭취할 경우 질병을 가진 사람에게는 그 영향이 더 크다고 볼 수 있다. Sildenafil 함유제제는 오남용우려의약품으로 지정되어 약사법으로 관리되고 있다(3). 발기부전치료제 성분인 sildenafil, tad-

*Corresponding author: Meehye Kim, Food Contaminants Division, Korea Food and Drug Administration, Cheongwon, Chungbuk 361-951, Korea

Tel: 82-43-719-4251

Fax: 82-43-719-4250

E-mail: meehkim@kfda.go.kr

Received November 3, 2009; revised June 15, 2011;

accepted August 10, 2011

alafil, vardenafil은 발기부전 환자들에게 처방되는 의약품으로 정력제가 아니며 오남용시 사망할 수도 있는 심각한 부작용이 우려되는 의약품으로 반드시 의사의 처방이 있어야만 사용할 수 있다(5). 식품공전(6)에는 발기부전치료제 및 그 유사물질을 불검출로 적용하여 관리하고 있다.

현재 발기부전치료제 및 유사물질등의 부정유해물질 검사가 주로 건강기능식품을 중심으로 이루어지고 있으나, 최근, 주류, 다류, 기타가공품 등의 식품 및 인터넷에서 성기능 강조한 제품을 대상으로 발기부전치료제 및 그 유사물질이 검출됨에 따라 식품을 대상으로 검사와 전반적인 실태조사가 필요하다. 따라서 유통되고 있는 식품에서 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종을 대상으로 발기부전치료제 및 그 유사물질의 혼입 실태를 모니터링하고자 하였다. 또한 현재까지는 HPLC/PDA(7-15), LC/MS/MS(10, 18-28), GC/MSD(29-31) 및 NMR(9,32-34)를 이용하여 sildenafil, vardenafil, tadalafil 및 그 대사물질의 분석방법 및 구조를 규명한 보고가 되어 있다. 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종에 대하여 동시분석이 가능한 동시분석법을 최적화하여, 유통 중인 검체에 대하여 발기부전치료제 및 그 유사물질이 함량을 분석하여 함유 실태를 파악하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

발기부전치료제 및 그 유사물질 24종을 모니터링하기 위하여 유통 중인 식품 및 건강기능식품을 226건을 수거하여 모니터링 검체로 사용하였다. 수거된 시료들은 검체별, 원산지(수입 및 국내), 검체구입 경로, 국가별(온라인) 수거 검체, 수거지역별로 구분하였다. 검체 수거는 식품의약품안전청 통계연보(35)에 따라 매출 현황, 제조업소 현황, 수입현황, 판매현황이 높은 검체 중에 부적합 이력이 있었던 검체를 수거 계획에 반영하였으며, 수도권 및 광역시, 그리고 인구 비율이 높은 지역을 고려한 10개 지역을 대상으로 수거를 실시하였다. 최근 인터넷 식품 및 건강기능식품 시장이 확대되고 있고, 소비자의 식품 및 건강기능식품의 구매 실태도 인터넷 구매가 증가하고 있으므로(36) 10개 포털 검색 사이트를 이용하여 검색하여 판매 사이트를 조사하고 검색시 빈도가 높고 성기능 표방 제품을 판매하는 사이트를 선정하여 인터넷 수거를 수행하였다. 시료 채취는 식품공전 식품별 검체 채취방법(6)에 따라 채취하였고, 채취한 시료는 분석시까지 냉동 보관하였다.

시약 및 초자

Icariin, yohimbin을 포함한 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질 표준품은 식품의약품안전청으로부터 분양받아 사용하였다. 시약은 sodium 1-hexanesulfonate(TCI-Ace, Kita-Ku, Tokyo, Japan), phosphoric acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 Ammonium formate(99.995%, Sigma-Aldrich)를 사용하였다. 용매로서 메탄올(HPLC grade, Burdick & Jackson, Seoul, Korea)과 아세트나이트릴(HPLC grade, Burdick & Jackson)을 사용하였으며, 시료 전처리에 사용되는 물 및 이동상은 초순수를 사용하였다.

표준용액 조제

Yohimbin, icariin을 포함한 발기부전치료제 24종의 표준원액(Stock Solution)은 표준품을 20 ± 0.1 mg 질량을 측정하고 10 mL 또는 20 mL 용량 플라스크에 넣는다. Tadalafil, aminotadalafil, benzylsildenafil, thiosildenafil, dimethylthiosildenafil은 이동상에 녹여 20 mL(1000 mg/kg)로 하고, 발기부전치료제 및 유사물질 19종

은 메탄올로 녹여 10 mL(2000 mg/kg)로 하였다. 조제한 표준원액은 냉동고에 보관하였다. 준비된 개별 stock solution을 HPLC/PDA로 분석을 수행하기 위하여 1-50 mg/kg이 되도록 첨가한 후 메탄올로 녹여 혼합 표준용액(Working standards)으로 사용하였으며, LC/MS/MS 정성 분석을 수행하기 위하여 1-500 µg/kg 농도가 되도록 메탄올로 조제하여 혼합표준용액으로 사용하였다.

시료의 전처리

본 연구에서는 다양한 식품 및 건강기능식품을 측정해야 하므로 시간을 단축할 수 있는 스크리닝 방법에 대하여 회수율을 검증하여 전처리 방법에 적용하였으며, 식품 중에 점도가 높거나 천연물이 함유되어 있는 매트릭스 효과가 큰 식품의 경우는 식품공전 방법(6)을 사용하였다.

스크리닝 방법 시료 전처리는 액체 시료인 다류(액상추출차), 주류는 5 g을 취하여 메탄올을 사용하여 50 mL로 희석하고 초음파 진탕기를 이용하여 30분간 추출한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였다. 환제, 캡슐제와 같은 건강기능식품(영양보충용제품, 인삼제품류 등)과 고체시료인 다류(추출차, 침출차등), 기타가공식품은 일정량을 취해 막자사발을 이용하여 균질화하여 시료로 사용하였다. 균질화한 시료 1 g을 취하여 메탄올을 가하여 초음파진탕기로 추출하고 원심분리(4000 rpm, 5분간) 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 하였다.

식품공전 방법(6) 시료 전처리는 액체시료와 고체시료의 일정량을 물 10 mL로 녹이고 메탄올 70 mL를 가하고 진탕 추출한 후 여과지로 여과하였다. 여액에 1% 중탄산나트륨 약 1 mL를 가하고 디클로로메탄 50 mL로 3회 추출한 후 디클로로메탄층을 모아 삼각 플라스크에 옮겨 적당량의 무수황산나트륨을 넣어 때때로 흔들어 섞으면서 30분간 방치하여 수분을 제거하였다. 이 액을 40°C 이하의 수욕상에서 감압하여 디클로로메탄을 날려보내고 잔사를 메탄올 또는 이동상에 녹여 일정량으로 한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 시험 용액으로 사용하였다. 추출 및 희석만으로 분석이 곤란한 점도가 강한 추출물 시료와 여러 가지 천연물이 혼합되어 있는 천연물 시료는 식품공전방법(6)으로 전처리하여 시험용액으로 하였다.

기기분석

발기부전치료제 및 그 유사물질의 기기분석은 HPLC/PDA(Alliance 2695 separation module and 2998 photodiode array detector, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하였으며, 분석에 사용한 column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120(4.6 mm I.D.×250 mm, 5 µm, Shiseido, Tokyo, Japan)이며, 0.1% sodium-1-hexane sulfonate용액에 phosphoric acid를 0.1% 되도록 혼합한 액과 95% acetonitrile을 조제한 이동상을 사용하였다. 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 peak이 겹치지 않도록 이동상의 gradient 조건을 조정하여 Table 1의 조건으로 분석하였다. 유속은 1 mL/min로 흘려주고 HPLC injector에 표준품과 시험용액을 10 µL 주입하여 200-400 nm에서 PDA 검출기로 spectrum 형태를 확인하였으며, UV 291 nm에서 정량하였다. 분석한 결과는 Fig. 1에 나타내었으며 24종의 발기부전치료제 및 유사물질에서 특이성이 있었다. 검출된 발기부전 치료제 및 그 유사물질은 LC/MS/MS(US/API 4000, Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)를 이용하여 확인하였다. Column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120(2.0 mm I.D.×150 mm, 5 µm, Shiseido)를 사용하였으며, 이동상은 0.1% ammonium formate와 acetonitrile을 사용하여 Table 2의 조건으로 유속 0.25 mL/min에서 표준품과 시험용액을 5 µL 주입하여 분석하였다.

Table 1. Operating condition for HPLC/PDA

Column	Capcellpak C ₁₈ UG 120 (4.6 mmI.D.×250 mm, 5 μm)		
Mobile phase	A: 0.1% phosphoric acid and Sodium-1-hexane sulfonate B: 95% Acetonitrile		
Gradient	Time	A%	B%
	Init.	90	10
	2.0	90	10
	14.0	75	25
	25.0	68	32
	30.0	67	33
	32.0	65	35
	36.0	50	50
	40.0	0	100
	42.0	0	100
	42.1	90	10
	45.0	90	10
Flow rate	1.0 mL/min		
Column Temp.	40°C		
Injection Vol.	10 μL		
Detector	UV 291 nm (200-400 nm)		

Table 2. Operating condition of LC/MS/MS for 24 anti-impotence drugs and their analogues

Column	Capcellpak UG 120 (2.0 mmI.D.×150 mm, 5 μm)		
Mobile phase	A: 0.1% Ammonium formate B: Acetonitrile		
Gradient	Time	A%	B%
	Init.	95	5
	2.0	95	5
	2.5	80	20
	3.0	30	70
	7.0	5	95
	12.0	5	95
	12.5	95	5
	15.0	95	5
Flow rate	0.25 mL/min		
Column Temp.	40°C		
Injection Vol.	5 μL		
Detector	MS MRM mode		

결과 및 고찰

시료 분석 최적화

24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 HPLC/PDA 분석법은 검출한계, 직선성, 회수율 실험을 통하여 시료 및 분석방법을 최적화 하였다. 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 검출한계는 물질마다 차이는 있으나, 신호대잡음비 3이상에서 0.03-0.10 mg/kg이었다. 검출한계는 Choi 등(7)의 0.05 mg/kg과 유사하였으며, Jang 등(10)의 1 mg/kg보다는 낮았다. 24종의 발기부전치료제 및 유사물질을 농도별(1, 5, 10, 25, 50 mg/kg)로 측정된 결과 linear range가 1-50 mg/kg이었다. Choi 등(7)의 5-100 mg/kg과 Jang 등(10)의 1-50 mg/kg과 유사하였다. 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 r^2 가 0.9966 이상으로 양호한 직선성을 나타내었다. Choi 등(7)의 vardenafil, hongdenafil, hydroxyhongdenafil, sildenafil, homosildenafil, tadalafil 6종에서는 직선성이 0.9947 이상으로 직선성이 유사하였다.

식품 및 건강기능식품 중 24종 발기부전치료제 및 그 유사물질을 분석하기 위한 전처리 방법을 시간을 단축시킬수 있는 방법으로 최적화하기 위하여 시료 종류(matrix)별로 회수율을 측정하여 전처리 방법을 검토하였다. 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종의 회수율은 시료 종류별로 식품(다류, 주류, 기타가공품)과

24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 동시분석법 확립을 위하여 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종을 각각 100 μg/kg 표준 용액을 질량분석기에 주입하여 각 표준성분에 적합한 MS 모드와 분자 이온을 찾은 후, 그 모드에서 정량성이 뛰어난 이온과 모드를 선택하였다. 선택한 이온과 모드에서 충돌에너지가 하여 분자이온을 딸이온(daughter ion)으로 쪼개고 에너지별 쪼개짐과 딸이온의 세기를 비교하여 최적의 딸이온이 생성하는 충돌에너지 및 기타 파라미터를 저장하여 MS/MS 조건을 확립하였다. 이와 같이 확립한 각 이온의 MS/MS조건과 HPLC의 분리 조건을 조합하여 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종 각각의 의약품 성분에 대한 매트릭스 효과 및 불순물에 대한 간섭을 확인한 후 시료간 간섭과 매트릭스 효과를 최소화한 이온을 확인하였다. 이때, 필요하면 MRM 조건을 재 선택한 후 최종적인 MRM 조건 및 LC/MS/MS 조건을 Table 3에 나타낸 것과 같이 23종의 발기부전치료제 및 유사물질은 mass range 50-550 amu에서 iacariin은 50-700 amu에서 표준품과 시험용액의 쪼개짐 이온(fragmentation ion)의 비율을 비교하여 정성 분석하였다. 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질 중 LC/MS/MS를 이용하여 acethylvardenafil을 분석한 TIC와 XIC는 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 1. Chromatogram of standard mixtures of 24 anti-impotence drugs and their analogues.

Table 3. MRM parameters of 24 anti-impotence and their analogues

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP
Acethylvaridenafil	467.3	151.2	141.0	63.0	10.0
		169.2		61.0	12.0
		341.2		45.0	8.0
Yohimbin	355.2	117.1	111.0	69.0	6.0
		143.2		77.0	10.0
		144.2		41.0	10.0
Hydroxyvaridenafil	505.2	151.2	126.0	69.0	12.0
		169.2		69.0	12.0
		312.2		55.0	8.0
Vardenafil	489.2	151.2	141.0	69.0	10.0
		169.2		61.0	12.0
		312.2		53.0	8.0
Carbodenafil	453.2	166.2	106.0	61.0	12.0
		311.1		45.0	8.0
		339.2		33.0	8.0
Hydroxyhongdenafil	483.3	70.1	121.0	87.0	4.0
		97.1		75.0	6.0
		143.2		45.0	10.0
Demethylhongdenafil	453.2	58.1	116.0	87.0	0.0
		70.1		69.0	4.0
		97.1		43.0	6.0
Hongdenafil	467.2	297.2	121.0	53.0	6.0
		311.2		53.0	8.0
		325.2		47.0	8.0
Icariin	675.3	351.1	-75.0	-64.0	-17.0
		367.1		-44.0	-9.0
		513.2		-14.0	-7.0
Piperidinohongdenafil	483.2	297.2	121.0	51.0	6.0
		325.2		45.0	8.0
		341.2		45.0	8.0
Hydroxyhomosildenafil	505.2	283.2	121.0	55.0	6.0
		311.2		45.0	8.0
		377.2		41.0	10.0
Sildenafil	475.1	100.3	116.0	41.0	6.0
		283.1		53.0	6.0
		311.1		41.0	8.0
Dimethylsildenafil	489.2	113.2	126.0	43.0	4.0
		283.2		55.0	4.0
		311.2		43.0	6.0
Homosildenafil	489.2	70.1	116.0	99.0	6.0
		72.1		85.0	6.0
		99.1		57.0	8.0
Aminotadalafil	391.1	149.1	91.0	29.0	12.0
		167.0		19.0	14.0
		269.0		19.0	14.0
Udenafil	517.2	112.2	131.0	47.0	8.0
		283.1		61.0	6.0
		325.2		51.0	8.0

Table 3. Continued

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP
Tadalafil	388.0	231.2	-75.0	-76.0	-3.0
		232.0		-50.0	-11.0
		262.0		-26.0	-13.0
Mirodenafil	532.2	268.2	131.0	71.0	6.0
		296.2		53.0	6.0
		312.2		55.0	8.0
Benzylsildenafil	551.2	134.2	131.0	49.0	10.0
		377.1		41.0	10.0
		459.1		37.0	12.0
Xanthoantrafil	390.1	77.0	66.0	121.0	4.0
		107.1		81.0	6.0
		151.1		19.0	12.0
Pseudovardenafil	460.2	151.2	126.0	61.0	10.0
		169.2		59.0	12.0
		312.2		51.0	8.0
Thiosildenafil	491.1	299.1	126.0	53.0	6.0
		327.1		41.0	8.0
		341.1		41.0	8.0
Dimethylthiosildenafil	505.0	271.2	126.0	61.0	6.0
		299.2		53.0	6.0
		327.2		43.0	8.0
Norneosildenafil	460.2	136.2	131.0	87.0	10.0
		283.2		49.0	6.0
		299.2		51.0	6.0

건강기능식품에 24종 발기부전치료제 및 그 유사물질 혼합표준 용액을 첨가하고 시료 전처리를 하여 최종농도가 10 mg/kg이 되도록 하였다. 발기부전치료제 및 그 유사물질의 검출된 농도와 발기부전치료제의 복용량이 성분별로 차이는 있으나 1일 최소 복용량이 sildenafil은 25 mg, vardenafil 5 mg, tadalafil 10 mg, udenafil 100 mg이므로 고농도임을 감안하여 직선성이 있는 농도 중 10 mg/kg의 농도가 되도록 첨가하였다. 회수율 측정 결과, 주류에서 평균 회수율은 105.0%이었고, 평균상대표준편차(RSD%)는 0.7로 주류 중에 스크리닝 전처리 방법이 타당한 것으로 사료된다. 다류 중 액상추출차와 고체시료인 침출차 및 추출차에서는 평균 회수율은 각각 107.7, 107.0%이었고, 상대표준편차(RSD%)는 0.3, 0.7로 다류 중의 스크리닝 전처리 방법이 타당한 것으로 검토되었다. Kim 등(8)은 액체시료 전처리시 스크리닝 방법을 이용하여 전처리하였으며, Shin 등(9)도 기타음료(추출음료)를 대상으로 스크리닝 전처리한 결과를 보고한 바 있다.

고체 시료인 건강기능식품과 기타가공품에서의 스크리닝 분석 방법으로 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질을 첨가한 경우, 회수율 측정 결과는 Table 4, 5와 같았다. Table 4에서 보는 것과 같이 건강기능식품 중 스크리닝 방법에 따라 전처리한 결과, 24종 발기부전치료제의 평균 회수율은 103.1%로 양호 하였으며 상대표준편차도 0.9로 양호하였으므로 전처리 방법으로 타당한 것으로 사료된다. 또한 기타가공품에서의 스크리닝 분석방법으로 전처리 후 회수율 측정된 결과는 Table 5에서 보는 바와 같이 회수율은 111.3%이였으며 상대표준편차도 1.5로 양호하였다. 분석

결과, 대부분 검출된 발기부전치료제 및 그 유사물질의 농도가 고농도이므로 스크리닝 방법으로 전처리했을 경우에도 분석시에 문제가 없었다. 따라서 고체 시료에도 스크리닝 전처리 방법을 적용하여 실험이 가능함을 확인하였다. Shin 등(9)의 식품 중의 sildenafil에 관한 연구와 Kim 등(8)의 sildenafil의 5종을 스크리닝 방법으로 한 연구와 일치하였다. 다만, 추출과 희석만으로 분석이 곤란한 점도가 강한 물질과 여러 가지 천연물이 혼합되어 있는 시료는 디클로로메탄으로 추출하는 과정을 거치는 식품 공전 방법(6)으로 수행하는 것이 분석하고자 하는 24종의 발기부전치료제의 분리를 위해 적합하였다. 이는 Kim 등(8)의 연구 보고 중의 전처리 방법에 대한 연구와 일치하였다. 따라서 식품의 종류 및 식품에 들어있는 성분에 따라 식품공전 및 스크리닝 전처리 방법을 적용하는 것이 타당하다고 사료된다.

24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 LC-MS/MS 분석법은 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종을 각각 100 µg/kg 표준용액을 질량분석기에 주입하는 FIA(Flow Injection Analysis) 방법

을 통해 ESI positive(+) mode와 negative(-) mode에서 분석하였다. Icaritin의 경우 분자식은 $C_{33}H_{40}O_{15}$ 이고 676.7의 분자량을 갖는 물질로서 ESI positive mode에서는 677 amu(atomic mass unit) 분자이온을 관찰하였으며, ESI negative mode에서는 675 amu(atomic mass unit) 분자 이온을 관찰하였다. 각 모드에서 이온의 세기를 비교하여 본 결과, icaritin의 경우는 ESI positive mode에서 보다 ESI negative mode에서 감도가 더 좋았으므로 negative mode에서 분석을 수행하였다. 또한 tadalafil의 경우 분자식은 $C_{22}H_{19}N_3O_4$ 이고 분자량은 389.4의 분자량을 갖는 물질로서 ESI positive mode에서는 390 amu(atomic mass unit) 분자이온을 관찰하였으며, ESI negative mode에서는 388 amu(atomic mass unit) 분자 이온을 관찰하였다. 각 모드에서 이온의 세기를 비교하여 본 결과, tadalafil의 경우도 ESI positive mode에서 보다 ESI negative mode에서 감도가 더 좋았으므로 negative mode에서 분석을 수행하였다. 따라서 시료간의 간섭 및 매트릭스 효과가 없는 한 ESI negative mode에서 분석하는 것이 타당하다는 결론을 얻었다.

Fig. 4. TIC Chromatogram (LC/MS/MS) of working solution of tadalafil (a), detected sample of tadalafil (b).

다. Acetylwardenafil의 21종의 발기부전치료제 및 그 유사물질을 각각 100 µg/kg를 FIA(FlowInjection Analysis)방법을 통하여 ESI positive(+) mode와 negative(-) mode에서 분석하였다. ESI positive mode와 ESI negative mode에서 분석한 경우 acetylwardenafil의 21종의 발기부전치료제 및 그 유사물질에서 감도가 ESI positive mode에서 감도면에서 더 좋은 결과를 얻었다. 따라서, 발기부전 치료제 및 그 유사물질 24종을 각각 질량분석기에 주입하여 ESI positive mode와 ESI negative mode에서 감도를 비교한 결과 icariin과 tadalafil의 경우는 ESI negative에서 acetylwardenafil의 21종에서는 ESI positive mode에서 감도가 더 좋은 결과를 얻었다. 따라서 icariin과 tadalafil의 경우는 ESI negative mode에서 그

외의 발기부전치료제 및 그 유사물질 22종에서는 ESI positive mode에서 분석하는 것이 타당하다는 결론을 얻었다.

24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질을 최적화된 MRM 조건과 HPLC 조건을 이용하여 식품 및 건강기능식품에 발기부전 치료제 및 그 유사물질 24종을 100 µg/kg가 되도록 첨가하고 분석하였을 때 얻은 크로마토그램을 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질이 들어 있지 않은 음성 검체와 비교할 때, 확립한 LC/MS/MS 조건에서 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 분리가 양호함을 알 수 있었다. 따라서 검출된 검체에 대하여 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질을 신속 정확하게 동시 정성이 가능함에 따라 시료 분석에 적용할 수 있을 것으로 사료된다.

식품 중 발기부전치료제 및 그 유사물질 함량 분석 결과

식품 및 건강기능식품을 수도권(서울, 경기, 인천) 69건, 강원도 12건, 대전충남 27건, 충북 29건, 부산경남 19건, 대구경북 17건, 광주전남 18건, 전북 20건, 온라인 인터넷 구매 15건 등 총 226건을 수거하고 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종에 대한 혼입실태 조사를 실시하였다. 기기의 오염여부 및 시료 분석 전 후에 carry over가 일어나지 않는지 확인 후 24종의 발기부전 치료제 및 그 유사물질 표준품 및 시료의 분석은 Table 1의 조건으로 HPLC/PDA를 이용하여 정량하였다. Table 2, 3의 분석조건으로 LC-ESI-MS-MS를 이용하여 발기부전치료제 및 그 유사물질 24종에 대하여 정성 시험을 수행하였다. 24종의 발기부전 치료제 및 그 유사물질의 모니터링 수행 중 수거한 총 226건의 시료

Table 4. Chromatogram of recovery data of 24 anti-impotence and their analogues in dietary supplement

Compounds	Spiked Concentration. (mg/kg)	Found (mean±SD, %)	
		Recovery (%)	%RSD
Acetylwardenafil	10	93.0±0.1	0.1
Yohimbin	10	99.2±5.5	5.5
Hydroxywardenafil	10	97.1±0.5	0.5
Vardenafil	10	103.8±0.7	0.7
Carbodenafil	10	107.0±0.4	0.4
Hydroxyhongdenafil	10	93.6±0.6	0.6
Demethylhongdenafil	10	99.3±1.0	1.0
Hongdenafil	10	100.7±1.2	1.2
Icariin	10	123.0±2.0	1.6
Piperidinohongdenafil	10	103.1±0.7	0.7
Hydroxyhomosildenafil	10	102.6±0.5	0.5
Sildenafil	10	105.6±0.3	0.3
Dimethylsildenafil	10	97.7±0.9	0.9
Homosildenafil	10	109.5±0.3	0.3
Aminotadalafil	10	107.1±0.1	0.1
Udenafil	10	107.5±0.3	0.3
Tadalafil	10	102.0±0.4	0.4
Mirodenafil	10	94.1±1.4	1.5
Benzylsildenafil	10	108.2±0.8	0.7
Xanthoantrafil	10	104.5±0.7	0.7
Pseudovardenafil	10	101.8±0.9	0.9
Thiosildenafil	10	104.8±1.7	1.6
Dimethylthiosildenafil	10	101.0±0.0	0.0
Norneosildenafil	10	107.5±0.4	0.4
Average		103.1±0.9	0.9

Table 5. Recovery data of 24 anti-impotence and their analogues in other processed products

Compounds	Spiked Concentration. (mg/kg)	Found (mean±SD, %)	
		Recovery (%)	%RSD
Acetylwardenafil	10	110.2±3.3	3.0
Yohimbin	10	103.8±0.3	0.3
Hydroxywardenafil	10	116.1±0.3	0.3
Vardenafil	10	119.8±0.4	0.3
Carbodenafil	10	110.8±0.7	0.6
Hydroxyhongdenafil	10	104.9±1.1	1.0
Demethylhongdenafil	10	103.9±0.9	0.9
Hongdenafil	10	103.4±0.6	0.6
Icariin	10	122.2±3.4	2.8
Piperidinohongdenafil	10	100.5±1.3	1.3
Hydroxyhomosildenafil	10	115.1±1.1	1.0
Sildenafil	10	112.6±0.6	0.5
Dimethylsildenafil	10	111.5±2.4	2.2
Homosildenafil	10	111.8±0.5	0.4
Aminotadalafil	10	112.3±1.4	1.2
Udenafil	10	108.6±0.5	0.5
Tadalafil	10	110.4±1.7	1.5
Mirodenafil	10	138.6±9.8	7.1
Benzylsildenafil	10	113.0±1.9	1.7
Xanthoantrafil	10	116.7±0.6	0.5
Pseudovardenafil	10	109.1±0.7	0.6
Thiosildenafil	10	88.7±3.6	4.1
Dimethylthiosildenafil	10	108.4±3.3	3.0
Norneosildenafil	10	119.9±1.6	1.3
Average		111.3±1.8	1.5

Table 6. The result of monitoring for anti-impotence drugs and their analogues in food

Type	Compound	Detected amount
Product of male sexual promotion function	Acethylvardeafil	21,476 mg/kg(15 mg/capsule) ¹⁾
	Tadalafil	18,298 mg/kg(11 mg/capsule) ¹⁾
Product of male sexual promotion function	Tadalafil	55,545 mg/kg(33 mg/capsule) ¹⁾
Product of male sexual promotion function	Tadalafil	16,027 mg/kg(9 mg/capsule) ¹⁾
	Sildenafil	52,778 mg/kg(29 mg/capsule) ¹⁾
Product of male sexual promotion function	Tadalafil	9,772 mg/kg(6 mg/capsule) ¹⁾
Product of male sexual promotion function	Sildenafil	71,535 mg/kg(48 mg/capsule) ¹⁾

¹⁾Average of capsules weight

중에서 인터넷에서 성기능을 강조한 제품 5건에서 발기부전치료제 및 그 유사물질이 검출되었으며, 검출량은 Table 6과 같다. 발기부전치료제 및 그 유사물질의 동시분석 결과, acethylvardeafil이 1종에서 21,476 mg/kg(15 mg/capsule)이었으며, sildenafil이 2종에서 각각 52,778 mg/kg(29 mg/capsule), 71,535 mg/kg(48 mg/capsule)이었고, Tadalafil이 4종에서 9,772 mg/kg(6 mg/capsule)-55,545 mg/kg(33 mg/capsule)이 검출되었다. 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 HPLC chromatogram과 인터넷에서 성기능을 강조한 제품 중 대표적으로 tadalafil이 검출된 chromatogram은 Fig. 3(b)에 나타내었으며, tadalafil 표준품과 검출된 시료의 retention time이 일치하였고, Fig. 3(c)에서 보는 바와 같이 tadalafil 표준품의 PDA spectrum과 검출된 시료의 PDA spectrum이 일치함을 알 수 있었다. 검출된 성분을 정성하기 위하여 LC-ESI-MS-MS를 이용하여 분석한 tadalafil의 TIC와 검출된 시료의 TIC는 Fig. 4에 나타내었으며, tadalafil의 daughter ion인 m/z 232, m/z 262 등의 peak가 검출됨을 확인하였다. 성기능을 강조한 제품의 발기부전치료제 및 그 유사물질의 검출 경향은 한 시료에서 여러가지 발기부전치료제 및 그 유사물질이 검출된 보고(37)와 일치하였으며, 발기부전치료제 뿐만 아니라 그 유사물질도 함께 검출됨을 알 수 있었다. 식품 및 건강기능식품, 성기능 표방 제품을 소비자의 구매 패턴에 따라 백화점, 마트뿐만 아니라 통신판매의 하나인 인터넷에서 수거하여 분석한 결과 발기부전치료제 및 그 유사물질이 검출됨에 따라 오남용의 우려가 있고, 정해진 용법대로 의사의 처방전에 따르지 않을 경우 부작용이 따르므로, 온라인 수거검사를 상시 검사와 하고 지속적으로 모니터링이 수행되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 국내/수입 유통되는 식품과 건강기능식품의 발기부전치료제 및 그 유사물질 혼입 농도를 모니터링하고, 그 결과를 바탕으로 식품의 안전성을 확보하고자 하였다. 전국에서 유통 중인 식품 및 건강기능식품 총 226건을 구입하고 24종의 발기부전치료제 및 그 유사물질을 HPLC/PDA 및 LC-ESI-MS-MS를 이용하여 분석하였다. 고체 및 액체 시료의 전처리하는 메탄올을 이용하여 추출하였다. 식품 및 건강기능식품 시료에서 확립된 시험법을 이용하여 식품과 건강기능식품 226건을 수거하여 모니터링한 결과, 5건의 성기능 표방 제품에서 acethylvardeafil, sildenafil, tadalafil이 검출되었다. 분석 결과, 검출량은 acethylvardeafil이 1종에서 21,476 mg/kg(15 mg/capsule)이었으며, sildenafil이 2종에서 각각 52,778 mg/kg(29 mg/capsule), 71,535 mg/kg(48 mg/capsule)이었고, tadalafil이 4종에서 9,772 mg/kg(6 mg/capsule)-55,545 mg/kg(33 mg/capsule)이었다. 따라서 식품 및 건강

기능식품 중의 발기부전치료제 및 그 유사물질에 대한 지속적인 실태조사가 요구된다.

문 헌

1. KFDA. Anti-impotence drug and their analogues. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2004)
2. KISTI. Erectile Dysfunction. Korea Institute of Science and Technology Information, Seoul, Korea. pp. 5-41 (2003)
3. KFDA. Regulation of designation for abused and concerned drugs. Korea Food & Drug Administration. Notice 2002-7. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2002)
4. KFDA. Analysis of Medicine Component in Dietary Supplement. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 75-88 (2005)
5. Boyce EG, Umland EM. Sildenafil citrate: A therapeutic update. Clin. Ther. 23: 2-23 (2001)
6. KFDA. Food code. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea (2010)
7. Choi DM, Im MH, Lee KJ, Kwon KI, Jeong JY, Park GS, Hong MK, Lee CW. Determination anti-impotence drug-like compounds in food. Anal. Sci. Technol. 17: 520-526 (2004)
8. Kim DB, Park KS, Park HK, Gu YE, Jang JH, Choi YJ, Kim BY, Jeong HY, Kim DH, Shim SY, Kim MS, Kim CM. Monitoring on illegally contained drugs in health functional foods. Annual Rep. KFDA. 6: 492-506 (2002)
9. Shin MH, Hong MK, Kim WS, Lee YJ. Studies on the sildenafil in foods. Annual Rep. KFDA. 6: 459-462 (2002)
10. Jang JH, Park KS, Park HK, Koo YE, Choi YJ, Hwang IK, Kim DB. Simultaneous identification/determination system for sildenafil, homosildenafil, vardenafil, and tadalafil as adulterants in foods. J. Food Hyg. Safety 18: 195-201(2003)
11. Liaw J, Chang TW. Determination of transdermal sildenafil in nude mouse skin by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B 765: 161-166 (2001)
12. Myung SW, Park SH, Cho HW. Analysis of sildenafil and its analogues by LC/MS/MS. Anal. Sci. Technol. 16: 488-198 (2003)
13. Guermouche MH, Bensalah K. Solid phase extraction and liquid chromatographic determination of sildenafil and N-demethyl-sildenafil in rat serum with basic mobile phase stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. J. Pharm. Biomed. Anal. 40: 952-957 (2006)
14. Cho JY, Lim HS, Yu KS, Shim HJ, Jang IJ, Shin SG. Sensitive liquid chromatography assay with ultraviolet detection for a new phosphodiesterase V inhibitor DA-8159 in human plasma and urine. J. Chromatogr. B 795: 179-183 (2003)
15. Shin C, Hong M, Kim D, Lim Y. Structure determination of a sildenafil analogue contained in commercial herb drinks. Magn. Reson. Chem. 42: 1060-1062 (2004)
16. Jeong CKK, Lee HY, Jang MS, Kim WB, Lee HS. Narrowbore high-performance liquid chromatography for the simultaneous determination of sildenafil and its metabolite UK-103,320 in human plasma using column switching. J. Chromatogr. B 752: 141-147 (2001)

17. Dinesh ND, Vishukumar BK, Nagaraja P, Made Gowda NM. Stability indicating RP-LC determination of sildenafil citrate (Viagra) in pure form and in pharmaceutical samples. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29: 743-748 (2002)
18. Zhu X, Xiao S, Chen B, Zhang F, Yao S, Wan Z, Yang D, Han H. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil, and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1066: 89-95 (2005)
19. Reepmeyer JC, Woodruff JT. Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a chemical cleavage reaction for the structure elucidation of a new sildenafil analogue detected as an adulterant in an herbal dietary supplement. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 44: 887-893 (2007)
20. Gratz SR, Flurer CL, Wolnik KA. Analysis of undeclared synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors in dietary supplements and herbal matrices by LC-ESI-MS and LC-UV. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36: 525-533 (2004)
21. Zhu X, Xiao S, Chen B, Zhang F, Yao S, Wan Z, Yang D, Han H. Simultaneous determination of sildenafil, vardenafil and tadalafil as forbidden components in natural dietary supplements for male sexual potency by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1066: 89-95 (2005)
22. Reepmeyer JC, Woodruff JT. Use of liquid chromatography-mass spectrometry and a hydrolytic technique for the detection and structure elucidation of a novel synthetic vardenafil designer drug added illegally to a "natural" herbal dietary supplement. *J. Chromatogr. A* 1125: 67-75 (2006)
23. Wang Y, Wang J, Cui Y, Fawcett JP, Gu J. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma. *J. Chromatogr. B* 828: 118-121 (2005)
24. Kim J, Ji HY, Kim SJ, Lee HW, Lee SS, Kim DS, Yoo M, Kim WB, Lee HS. Simultaneous determination of sildenafil and its active metabolite UK-103,320 in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32: 317-322 (2003)
25. Eerkes A, Addison T, Naidong W. Simultaneous assay of sildenafil and desmethylsildenafil in human plasma using liquid chromatography-tandem mass spectrometry on silica column with aqueous-organic mobile phase. *J. Chromatogr. B* 768: 277-284 (2002)
26. Bogusz MJ, Hassan H, Al-Enazi E, Ibrahim Z, Al-Tufail M. Application of LC - ESI - MS - MS for detection of synthetic adulterants in herbal remedies. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41: 554-564 (2006)
27. Zou P, Oh SSY, Hou P, Low MY, Koh HL. Simultaneous determination of synthetic phosphodiesterase-5 inhibitors found in a dietary supplement and pre-mixed bulk powders for dietary supplements using high-performance liquid chromatography with diode array detection and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1104: 113-122 (2006)
28. Lam YH, Poon WT, Lai CK, Chan AYW, Mak TWL. Identification of a novel vardenafil analogue in herbal product. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 46: 804-807 (2008)
29. Sheu MT, Wu AB, Yeh GC, Hsia A, Ho HO. Development of a liquid chromatographic method for bioanalytical applications with sildenafil. *J. Chromatogr. B* 791: 255-262 (2003)
30. Cho JY, Lim HS, Yu KS, Shim HJ, Jang IJ, Shin SG. Sensitive liquid chromatography assay with ultraviolet detection for a new phosphodiesterase V inhibitor DA-8159 in human plasma and urine. *J. Chromatogr. B* 795: 179-183 (2003)
31. Snyman T, Stewart MJ, Grove A, Steenkamp V. Adulteration of South African traditional herbal remedies. *Ther. Drug Monit.* 27: 86-89 (2005)
32. Zou P, Hou P, Oh SSY, Chong YM, Bloodworth BC, Low MY, Koh HL. Isolation and identification of thiohomosildenafil and thiosildenafil in health supplements. *J. Pharm. Biomed. Anal.* in press (2008)
33. Shin MH, Hong MK, Kim WS, Lee YJ, Jeoung YC. Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. *Food Addit. Contam.* 20: 793-796 (2003)
34. Park HJ, Jeong HK, Chang MI, Im MH, Jeong JY, Choi DM, Park K, Hong MK, Youm J, Han SB, Kim DJ, Park JH, Kwon SW. Structure determination of new analogues of vardenafil and sildenafil in dietary supplements. *Food Addit. Contam.* 24: 122-129 (2007)
35. KFDA. Food and Drug Statistical Year Book. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 25-163 (2007)
36. KFDA. Research on the Actual Condition of Food Production & Sale Site on Internet and Monitoring of Health Food. Korea Food & Drug Administration. Seoul, Korea, pp. 17-54 (2003)
37. KFDA. PDE-5 Inhibitors and Their Analogues Detection Survey. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 2-4 (2006)