



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학박사학위논문

식품보조제 내 불법 첨가물에
대한 분석

Analysis of adulterated compounds in dietary
supplements

2014년 7월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
노시훈

약학박사학위논문

식품보조제 내 불법 첨가물에
대한 분석

Analysis of adulterated compounds in dietary
supplements

지도교수 권성원

이 논문을 약학박사 학위 논문으로 제출함
2014년 7월

서울대학교 대학원
약학과 약품분석학전공
노시훈

노시훈의 박사학위 논문을 인준함
2014년 7월

위원장	<u>박 정 일</u> (인)
부위원장	<u>성 상 현</u> (인)
위 원	<u>홍 순 선</u> (인)
위 원	<u>최 용 석</u> (인)
위 원	<u>권 성 원</u> (인)

국문 초록

인체 내부에 들어갈 경우 심각한 영향을 끼칠 수 있는 독성물질들의 투입 경로는 대부분 식이를 통한 섭취로 인한 것이 대부분이다. 최근에, 특정한 목적을 위해 생산되는 보조식품 중 허가되지 않는 활성 성분이 식품 내부에 첨가하여 시판되는 경우가 늘고 있다. 또한 품질 검사를 회피하기 위해서 여러 성분을 미량으로 복합적으로 첨가하는 경향이 나타났다. 이에 본 연구에서는 식품보조제 내부의 PDE-5 inhibitor와 그 유사물질, sibutramine 계열 화합물 분석 방법을 개발하기 위한 연구를 진행하였다.

먼저 식품 내부의 PDE-5 inhibitor와 그 유사물질 및 sibutramine 계열의 물질을 동시에 분석하기 위해 UPLC-Q-TOF MS를 사용하여 그 물질의 분자량을 통해 isotopic distribution 확인 및 fragmentation 패턴을 통해 분석할 수 있었다.

두 번째로 보통 식품 속에는 분석을 방해할 수 있는 다량의 matrix로 작용할 수 있는 물질들의 종류가 매우 많은데 그러한 matrix들을 제거하고 또한 매우 적은 양의 PDE-5 inhibitor와 그 유사물질을 검출하기 위하여 Solid phase extraction과 Dispersive liquid-liquid extraction을 이용하여 ng mL^{-1} 수준의 첨가물들을 Mass spectrometer를 통하지 않고서도 분석할 수 있는 미량 분석

법을 개발하였다.

이러한 PDE-5 inhibitor와 그 유사물질, sibutramine 계열 화합물에 대한 분석방법의 개발은 인체에 유해할 수 있는 물질을 사전에 차단하는데 도움이 될 것으로 판단된다.

주요어: PDE-5 inhibitor, 시부트라민 (Sibutramine),

초고성능 액체 크로마토그래피(Ultra performance Liquid chromatography), 식이 보조제 (Dietary supplement), Solid phase extraction, Dispersive liquid-liquid microextraction,

학번: 2006-21967

목 차

국문 초록	i
목 차	iii
List of Figures	vii
List of Tables	ix
List of Abbreviations	x
I. 서 론	1
1. PDE-5 억제제의 발달	1
2. Sibutramine의 사용 및 금지	4
3. 건강기능식품의 대두 및 불법적인 첨가물	5
4. PDE-5 억제제와 그 유사물질	8
5. UPLC와 Q-TOF의 발전	12
6. DLLME의 개발 및 발전	13
II. 실험 방법	15

1. 실험 재료 및 기기	15
1-1. 재료 및 시약	15
1-2. 실험 기기	16

Part 1. UPLC/Q-TOF를 이용한 PDE-5 inhibitor와
sibutramine 및 그 유사물질의 동시 분석

2. 기기 조건	17
3. Q-TOF mass calibration	19
4. 샘플 제조	19
5. 밸리데이션	21

Part 2. SPE와 연계된 DLLME-SFO를 이용한
sildenafil과 그 유사물질 분석

2. 기기 조건	22
3. 샘플 제조	23
4. Solid phase extraction	26
5. Dispersive liquid-liquid extraction on	

solidification of organic droplet	27
6. 밸리데이션	29
III. 결과 및 고찰	30
Part 1. UPLC/Q-TOF를 이용한 PDE-5 inhibitor와 sibutramine 및 그 유사물질의 동시 분석	
1. 크로마토그램(XIC)과 분자량의 정확도	30
2. Isotopic distribution	34
3. MS/MS fragmentation	42
4. 밸리데이션	47
5. 실제 샘플 적용	49
Part 2. SPE와 연계된 DLLME-SFO를 이용한 sildenafil과 그 유사물질 분석	
1. Ion pairing chromatography를 이용한 주요 성분 분리	51
2. SPE 최적화	53

3. DLLME 최적화	56
4. 밸리데이션	62
5. 시용된 DLLME와 기존 DLLME와의 차이점	65
6. 실제 샘플 적용	69
IV. 결론	77
V.참고 문헌	79
Abstract	94

List of Figures

Figure 1. Molecular mechanism of PDE-5 inhibitors to erectile function	3
Figure 2. Case reports of detected adulterated supplements in Korea	7
Figure 3. Sildenafil and its five analogues	25
Figure 4. Extract ion chromatogram of the six compounds	32
Figure 5. Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues	36
Figure 6. Mass fragment of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues	43
Figure 7. Adulterated supplements among the collected supplements	50
Figure 8. UV chromatogram of sildenafil and its five analogues	52
Figure 9. UV chromatogram before and after mixed mode SPE-DLLME-SFO	54

Figure 10. Extraction solvent effect on enrichment factor	58
Figure 11. Solution pH effect of enrichment factor	61
Figure 12. Effect of extraction using SPE coupled with DLLME-SFO	67
Figure 13. The chromatograms of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO	71

List of Tables

Table 1. Calculated and measured weights of the six compounds	33
Table 2. LOD and LOQ of the six compounds	47
Table 3. Accuracy and precision	48
Table 4. Linearity, R^2 value and sensitivity of current method	63
Table 5. Intra- and inter-day variation of the proposed method evaluated at three concentrations	64
Table 6. The declared content of multiple ingredients in dietary supplement as matrices	66
Table 7. Detected commercial dietary supplements by the developed method	70

List of Abbreviations

DLLME dispersive liquid–liquid microextraction

EMA europe medicines agency

FDA food and drug administration

HPLC high performance liquid chromatography

LC liquid chromatography

LOD limit of detection

LOQ limit of quantitation

PDE phosphodiesterase

PTFE polytetrafluoroethylene

Q–TOF quadrupole time of flight

SFO solidification of floating organic droplet

SPE solid phase extraction

UPLC ultra performance liquid chromatography

XIC extract ion chromatogram

I. 서론

1. PDE-5 억제제의 발달

Phosphodiesterase-5 inhibitor는 현재 발기부전에 대한 치료제로 널리 쓰이고 있다. PDE-5는 cyclic GMP를 5-GMP로 바꾸어주는 역할을 하는 esterase로 그에 대한 inhibitor는 PDE-5를 억제하여 발기가 사라지는 현상을 막아서 발기부전이 일어나는 것을 경감시킬 수 있다(Fig. 1).¹

기전 상 혈관 확장을 유지하는 현상이 일어나기 때문에 부작용이 일어날 경우 작으면 홍조나 경련, 근육 이상 심하면 심장마비까지 일어날 수 있어서 부작용의 범위가 굉장히 큰 약들로 알려져 있다². 비아그라로 알려진 sildenafil은 Pfizer에서 최초로 개발한 PDE-5 inhibitor 약물이며 선두 약물로서 시장에서 블록버스터로 인기를 끌었다. 비슷하게 뒤이어 vardenafil(Levitra^R)와 tadalafil(Cialis^R)가 Bayer사와 Eli-lily사에서 개발되어 시판되었다³. 이 약물들 중에 vardenafil 같은 경우는 sildenafil 보다 속효성인 대신 지속시간이 짧고, tadalafil의 경우는 지효성인 대신 지속시간이 긴 특징들을 가지고 있다^{4,5}.

대표적인 3개의 약물 이후로도 udenafil, mirodenafil, avanafil 같

은 PDE5 inhibitors 들이 개발되어 시판되고 있다⁶.

이런 상황으로 인하여 기존의 사용되었던 동식물의 부위를 가지고 만들거나 효과가 있다 전해지는 식물들로 만든 약제들은 매출이 떨어지는 상황을 맞이하게 되었다.

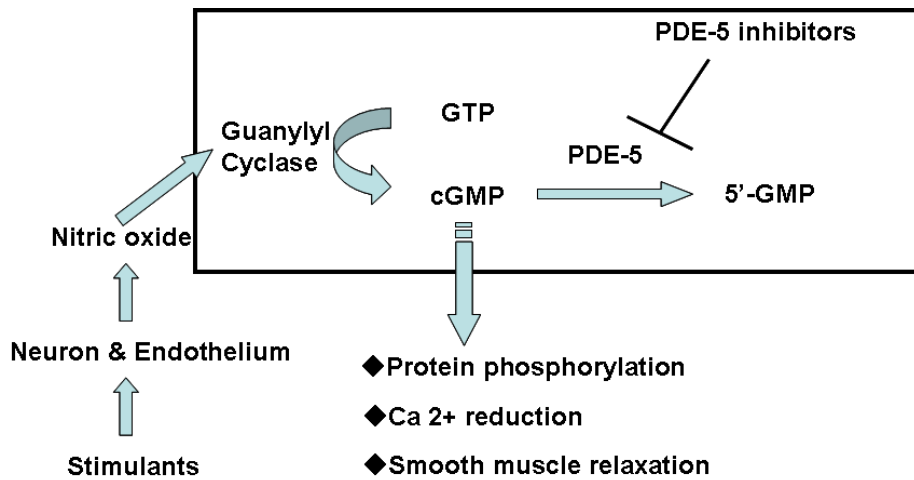


Figure 1 Molecular mechanism of PDE-5 inhibitors to erectile function (Ref 1.)

2. Sibutramine의 사용 및 금지

Sibutramine은 tertiary amine으로 잠재적인 항우울제로 알려진 화합물이었으며, 그 기전은 serotonin과 noradrenalin에 대한 re-uptake의 억제제로 작용하는 것이었다. 하지만 식욕의 증진과 관계된 serotonin과 noradrenalin의 흡수를 억제하기 때문에 식욕을 감소시키는 것이 알려져서 비만에 대한 몇 안 되는 효능을 지닌 약제로 시판되었다^{7,8}. Sibutramine은 체내에서 Sibutramine의 아미노기에서 demethylation이 일어나 두 가지 대사체인 N-desmentylsibutramine과 N,N-didesmentylsibutramine으로 변형되어 인체에 작용한다고 알려져 있다. 이 약물은 위약 실험을 했을 때 보다 적어도 5% 이상의 체중 감량을 일어나고 약 자체의 칼로리가 거의 없기 때문에 매우 뛰어난 약으로 보였다⁹(lancet). 실제로 비만 치료제로 사용할 수 있는 약은 sibutramine과 orlistat 정도 밖에 없었기 때문에 매우 선풍적인 인기를 끌었으나 이 약에 대한 뇌 내 신경전달물질 조절과 심혈관계 신경전달물질에 대한 영향이 매우 커서, 심장마비, 졸도 등심각한 부작용이 많이 발생하였다. 그 심각성에 대해서 조사에 들어간 결과, 이 약들은 FDA와 EMA로부터 판매 중지 및 회수 조치에 들어가게 되었으며 한국에서도 2010년 이후 판매를 중지하고 회수하라는 조치가 내려져 사실상 약으로서의 생명을 다하게 되었다¹⁰⁻¹².

3. 건강기능식품의 대두 및 불법적인 첨가물

전통적으로, 활성 성분을 가졌다고 믿는 식품을 복용하여 효능을 기대하는 것은 매우 당연한 것이다. 이 활성 성분을 가졌다고 주장하는 제품들은 최근 건강기능식품법이 제정됨에 따라 그 약효성분을 식별하여 그 양을 표시하도록 되어 있다¹³.

하지만 음성적으로 법적으로 건강기능식품이라 할 수 없는 제품들의 시장은 항상 존재해 왔으며, 점차 약효성분을 강화하기 위하여 무언가 첨가된 불법 건강기능식품들이 성기능 향상이나 체중감량을 표방하면서 시중에 유통되고 있다¹⁴⁻²⁰. 이러한 첨가물들은 보통 약으로 쓰이는 PDE-5 억제제나 위의 sibutramine 계열 화합물들이 주로 사용되는데 이는 당연히 허가 되지 않은 불법이며, 실제 활성 성분이 들어 있지 않은 성분의 활성을 유도하는데 쓰이고 있다. 이렇게 첨가되는 물질들은 보통 그 함량이 정확하지 않고, 그 품질에 대해서도 제대로 알 수 없는 형편이다.

유럽에서는 PDE-5 억제제를 구입하여 사용하는 경로로 2/3 정도는 합법적인 유통경로 즉 처방전을 통해서 구입하지만 나머지 1/3은 법적인 유통을 벗어나는 곳에서 구입하게 되고 있는데 이는 1년에 600만개 정도로 추산된다²¹.

더욱이, 같은 아시아이면서 바로 옆에 있는 일본에서 조사한 바에 따르면 합법적인 경로보다 비합법적인 경로로 유통되는 것이 2.5배

에 따른다고 하니 그 양이 대단하다고 할 수 있다²².

한국에서도 꾸준히 그러한 식이보조제 및 건강보조식품들이 유통되고 있으며 (Figure 2), 더욱이 체중 감량의 목적에 있어 sibutramine 계열 화합물과 PDE-5 억제제를 동시에 같이 넣어 체중 감소를 더욱 촉진시키려는 시도도 여럿 발견되고 있어 그 부작용이 더 막대할 것으로 예상되고 있다.

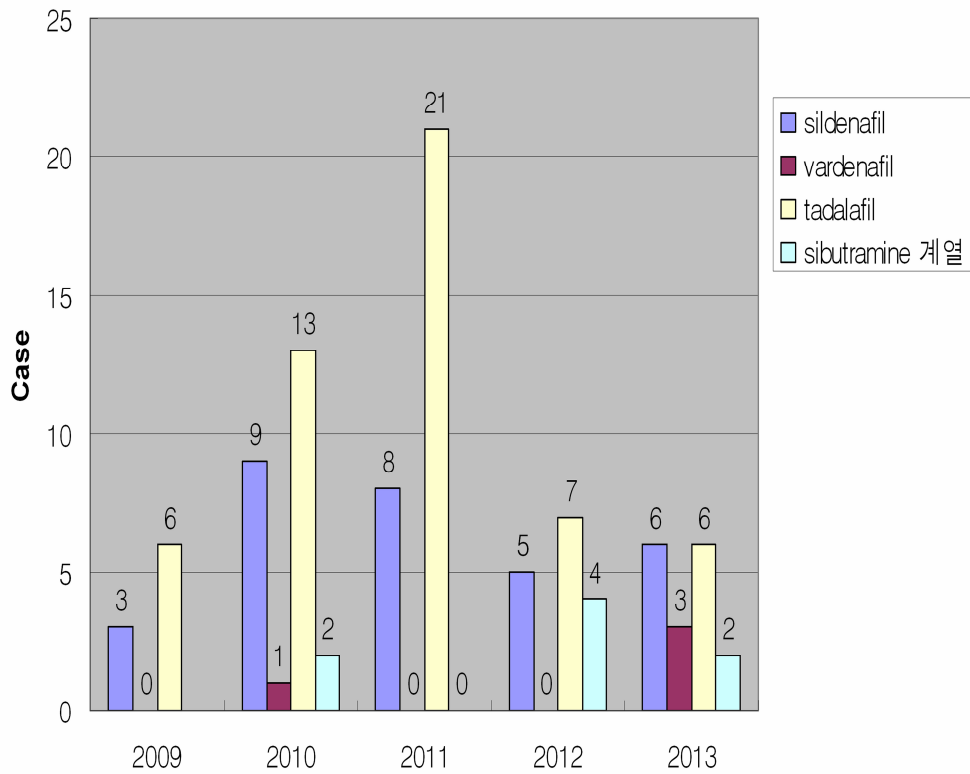


Figure 2 Case reports of detected adulterated supplements in Korea (참조: KFDA 보고서)

4. PDE-5 억제제와 그 유사물질

이러한 식품에 대한 품질 검사로 인해 시장 상황이 어려워지자, 생산자들은 이러한 검사를 피하기 위한 수단을 강구하기 시작했다. 성능 향상을 위한 검증된 PDE-5 inhibitor compound 대신 약간의 화학적 수식을 거친 유사물질들을 만들어 낸 것이다²³. 이러한 유사물질들은 대부분 PDE-5 inhibitor의 모핵을 그대로 유지하면서 가지를 이루는 부분을 변경하였다. 유사물질들은 사실 그 약효가 검증되지 않았을 뿐만 아니라 그 부작용 또한 제대로 알려지지 않아 PDE-5 inhibitor 보다 더 위험한 물질들이다. Sildenafil의 개발 이후에 2003년에 최초의 PDE-5 억제제 유사물질인 homosildenafil이 발견되고¹⁸ hydroxyhomosildenafil과 acetildenafil(Hongdenafil)이 1년 뒤에 발견되었다^{14,24-25}. 2006년 이후엔 sildenafil 뿐 아니라 vardenafil과 tadalafil의 유사물질까지 생기고 thiono기가 붙은 유사물질까지 만들어져서 최근에는 적어도 46개가 넘는 유사물질들이 만들어져 보고되고 있다^{3,26-32}. 현재 보고된 것이 이만큼일 뿐 아직 계속 만들어져서 새로운 유사물질들이 나타나 첨가될 것이다. 이러한 PDE-5 억제제 유사물질들이 만들어진 것은 공장에서 PDE-5 억제제를 만들 때 나올 수 있는 부산물들에서 시작되었다³³⁻³⁵. 효능이 있는 약을 개발하기 위해서 약의 효능에 중요한 부분과 그 화학적인 모양을 파악해야 하는데, 그 것을

위해서 다양한 형태를 띠면서도 비슷한 물질들을 합성해서 그 효능을 시험해 봐야 한다. 만약 약의 효능을 띤 부분을 알아냈다면 인체 내에 들어갔을 때 흡수, 분배, 대사가 잘 되는 적합한 화합물인지를 확인해야 하므로 약효를 가질 수 있는 다양한 물질들을 다시 합성해야 한다. 이러한 개발 단계로 인해 다양한 부산물들이 나오게 되는데 이 물질들이 주로 PDE-5 억제제 유사물질로 사용되어 지고 있다. 그리고 그 합성 단계들이 거의 특허로 지정되어 있어 열람이 가능하기 때문에 불법적으로 유사물질을 제조하려는 사람들에게 풍부한 정보를 제공하고 있다. 이에 PDE-5 억제제 유사물질들은 많아지는 것이 당연하고 계속 생성될 것이다.

그 PDE-5 inhibitor 유사물질 중 가장 많은 것은 sildenafil에 대한 유사물질이라고 할 수 있다. sildenafil은 가장 많이 팔리고 유명한 화합물로 그에 대한 유사물질이 많은 것 또한 당연한 일이다. Pfizer에서 특허로 내놓은 합성 전략을 사용하여 유사물질은 반합성체인 sildenafil Intermediate B³⁶⁻³⁸를 두 단계를 거쳐서 합성하게 되어 있다. 이 합성전략은 마지막 단계에서 변형체를 만들기가 쉽기 때문에 유사물질을 생성하기가 매우 용이하다. 결국, 황을 가진 sildenafil 유사물질이 2002년에 나타나 보고되었다³⁹. 이 물질은 sildenafil의 C=O 결합을 C=S로 치환한 것으로 sildenafil을 P₂S₅와 반응시켜 만들 수 있다. 이러한 치환은 기존의 sildenafil 보다

더 높은 독성을 가진다고 알려져 있다⁴⁰. 또 다른 유사물질로 처음으로 불법첨가물로 나타난 화합물은 aildenafil이다. 이 물질은 2005년에 중국에서 등록되었는데⁴¹⁻⁴³. 2007년에 Reepmeyer에 의해 처음으로 검출되었고 황기를 가진 유사물질 또한 식이보조제 속에서 검출되었다⁴⁴⁻⁴⁶. 최근엔 aildenafil의 다른 변형들이 많이 생기고 있는데, 기존의 유사물질의 다른 부분을 변형시킨 유사물질이 검출되고 있다⁴⁷⁻⁴⁹.

Sildenafil 이외에도 tadalafil도 그 지효성 때문에 더 효과를 나타내기 쉬운 화합물로 여겨져 여러 유사물질이 만들어 졌다. Tadalafil은 합성 시간이 더 짧은 관계로 더 용이한 것으로 나타났다⁵⁰. 하지만 의외로 sildenafil 보다 검출된 유사물질 양이 적는데 이 것은 tadalafil의 합성에 마약류인 매스암페타민류에 쓰이는 piperonal이 필요하기 때문이다. 이 물질은 매우 엄중하게 감시되고 있어 입수하기가 쉽지 않은 것으로 알려졌다^{51,52}. 만들어진 유사물질 형태 중 가장 알려진 것은 크게 중요하지 않은 amide의 N 위치에 다른 것을 수식한 것으로 이를 통해 다양한 유사물질을 만들어 내었다. 첫 번째 tadalafil 유사물질은 aminotadalafil이며 그 외에도 methyamine 구조를 개방하여 염소를 수식화한 chloropretadalafil^{26,53}이 나타났다. 2003년에는 amide의 N을 수식한 여러개의 유사물질이 나타났는데 그 중 3 종류가 식이보조제 속

에 들어있는 것을 검출하였다⁵⁴⁻⁵⁶.

Vardenafil의 경우엔 sildenafil과 합성 과정이 매우 유사하지만 보고된 유사물질의 종류가 훨씬 적다. 대부분 중요한 부분이 아닌 지엽적인 수식화를 통한 제조였으며, 이는 발동이 빠른 대신 지속성이 약하기 때문에 경제성에 있어 불리하기 때문인 것으로 보인다.

5. UPLC와 Q-TOF MS의 발달

Ultra performance liquid chromatography를 이용해 기존 HPLC보다 더 높은 압력에서 분리가 가능하게 되어 더 입자가 고운 컬럼을 사용할 수 있게 되었다. 그에 따라서 더 물질의 분리도가 향상되게 되어 더 짧은 시간에 더 정확한 분리능을 보일 수 있게 되어 널리 사용되고 있다⁵⁷.

Q-TOF MS는 기존 TOF MS의 분자량과 ion-trap MS의 빠른 MS/MS fragmentation 기능을 동시에 지닌 기기로 원하는 물질의 확인에 매우 유용하다⁵⁸⁻⁵⁹. 특히 LC와 연결되는 경우 기존 LC-TOF MS나 LC-ion trap MS보다 더 나은 정확도와 선택성을 보여주는 것으로 나타났다⁶⁰. 이러한 LC-Q-TOF MS의 장점은 많은 종류의 물질을 동시에 분석해야 하는 천연물, 대사체, 단백질, 당류, 오염물질 분석에 매우 유용하게 사용되고 있다⁶¹⁻⁶⁶.

본 연구 중 part 1.에서는 이러한 UPLC-Q-TOF MS를 사용하여 건강보조식품이나 식이보조제에 들어 있는 PDE-5 억제제 3종과 sibutramine 및 그 두 가지 유사물질을 분석하고자 하였다.

6. DLLME의 개발 및 발전

Dispersive liquid-liquid microextraction은 2006년 이란의 Rezaee에 의해 처음으로 세상에 소개되었다⁶⁷. 이 방법은 기존의 liquid-liquid extraction의 단점을 보완하고 많은 양의 추출용매와 긴 추출 시간을 줄일 수 있다는 점이 무엇보다 관심을 끌었다. 더욱이 환경적으로 green technology에 대한 관심이 높아졌을 때이고 매우 손쉽고 간단한 방법이었기 때문에 많은 시료에 적용되었다⁶⁸. 이 방식은 aqueous sample solution, 추출용매, dispersive 용매의 세 가지 구성요소로 이루어져 있다.

반면에 기존 DLLME에 사용되는 유기용매들을 바꾸려는 시도도 있었다. 기존 DLLME에 사용되는 유기용매들은 물보다 무거운 chloroform, methylen chloride 등의 인체에 유독하거나 환경에 좋지 않은 물질이 대부분이기 때문에 좀 더 환경 친화적인 물질로 교체하려는 것이었다. 이에 undecanol, hexadecane, dodecanol 등의 물보다 가벼운 추출유기용매를 사용하여 분석하는 방법이 개발되었다⁶⁹, 이러한 방법을 solidification of floating droplet 즉 줄여서 SFO로 일컫게 되는데, 이렇게 사용할 경우에 물보다 가벼운 유기용매 droplet이 위로 떠오르고 이 용매를 온도를 낮춰서 고체화시켜 꺼내기 때문에 이러한 명칭이 붙게 되었다. 위로 떠오른 유기용매 방울을 간단히 손가락 같은 걸로 떠내면 되기 때문에 시간이 적

게 걸리는 점도 있다.

이 논문의 Part 2에서는 이러한 DLLME-SFO를 이용하여 고형의 식품보조제 속에 들어 있을 수 있는 sildenafil과 그 유사물질 5종을 분석하였으며, 고체 상태라는 점을 극복하기 위하여 Solid phase extraction을 거쳐서 더욱 추출을 용이하게 하였으며 UV 검출기를 통해 분석하여 분석하는데 필요한 비용을 절감하고자 하였다.

II. 실험 방법

1. 실험 재료, 시약 및 기기

1-1 재료 및 시약

Sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine, N-desmethylsibutramine, N,N-didesmethylsibutramine, hongdenafil(acetyldenafil), homosildenafil, udenafil, benzyildenafil, thiosildenafil 의 표준품은 식품의약품안전청과 서울대 김득준 교수님 실험실에서 제공 받았다. HPLC 등급의 acetonitrile, MeOH, water 그리고 phosphoric acid는 Duksan(안산, 한국)과 Fisher(Fair lawn, NJ, USA)에서 구입하였으며 무수 sodium sulfate는 Junsei(Tokyo, Japan), Ammonia hydroxide, potassium phosphate monobasic(KH_2PO_4), 1-dodecanol, formic acid, sodium bicarbonate, sodium 1-hexanosulfate는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 얻었다. 1-undecanol, 2-dodecanol은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Ultra pure grade 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris)

는 Amresco(solon, ohio, USA)에서 구입하였다. Part 2에서 Sample matrix로 구입한 영양제는 한국의 약국에서 산 것이며, 적용하기 위해 구한 식이보조제들은 모두 중국에서 구입하여 들어온 것이다.

1-2 실험 기기

- Waters ACQUITY UPLC system
- Bruker micrOTOF-q II mass spectrometer
- Hystar chromatography software
- Compass Data analysis 4.0
- Waters ACQUITY UPLC column (50 × 2.1 mm. 1.7 μm)
- Phenomenex Luna column (250 × 4.6 mm. 5 μm)
- Agilent 1290 infinity system
- Agilent Technologies Chemstation for LC 3D system software
- Eppendorff Centrifuge 5415 R
- Eppendorff Centrifuge 5810 R

Part 1. UPLC/Q-TOF를 이용한 PDE-5 inhibitor
와 sibutramine 및 그 유사물질의 동시 분석

2. 기기 조건

- UPLC system

Column oven - 40 °C

Flow rate - 0.2 mL/ min

Mobile phase - A: 0.1% Formic acid, B: 0.1% Formic acid/
ACN

Injection volume - 10 μ L

Gradient condition - 10% B(2 min), 25% B(4 min), 40%
B(7 min), 70% B(10 min) 70% B(12 min)

- Q-TOF MS mass condition

Positive ion mode

Capillary voltage - 4.5 kv

Nebulizer pressure - 0.3 bar

Dry gas - 4 L/min

Dry temperature - 180 °C

Mass range – 100 – 1000 m/z

Collision energy – 10 or 30 eV

3. Q-TOF MS mass calibration

Q-TOF MS의 정확한 분자량을 유지하기 위해서 Li-formate를 LC에 sample을 주입할 때마다 그 전에 주입하여 Q-TOF MS의 분자량을 조정하는 방법을 사용하였다. 나온 분자량을 Li-formate와 비교하여 조정되었으며 대부분 2 ppm을 넘지 않도록 하였다.

4. 샘플 제조

50개의 대상 보충제 및 건강보조식품들은 모두 웹사이트 상에서 구매하였다. PDE-5 inhibitor에 대한 추출 방법은 논문과 식품공전을 참조하여 실행하였다^{70,71}. 식품 내 PDE-5 억제제의 추출과정은 약 500 mg의 sample을 물과 메탄올의 혼합액 80 mL(1:7)로 30분간 bath에서 sonication 한 뒤에 용액을 종이 여과지로 여과하고 여과된 시액에 1% sodium bicarbonate를 더한 후 분별깔때기에 넣고 dichloromethane으로 흔들어 3번 추출한다. 추출을 거친 뒤 유기층을 모아서 Na₂SO₄를 이용해 잔류 수분을 제거한 후 감압농축기를 사용해 40도의 수온에서 모두 유기층을 날리고 남은 잔사를 메탄올로 녹인 후 hongdenafil (20 µg/mL)을 IS로 넣은 뒤 0.2 µm PTFE 필터로 여과하여 LC-MS에 주입했다.

비만 치료제에 들어 있을 것으로 생각되는 sibutramine과 그 유사

물질들은 극성이 강하여 위의 추출 방법으로는 추출할 수 없었기 때문에 비만치료제로 사용되는 보조식품에 대해서는 오직 메탄올을 이용하여 30분간 bath에서 sonication 한 후 그 용액을 0.2 μm PTFE 필터로 여과하여 LC-MS에 주입하였다.

5. 밸리데이션

방법의 직선성을 획득하기 위해서 표준용액을 정해진 농도만큼 LC-MS에 주입하였다(2, 6, 10, 14, 20, 40 $\mu\text{g g}^{-1}$). 피크의 표면적을 구하기 위해 사용한 프로그램은 Bruker사의 Compass data analysis 4.0이었으며, 검출한계(LOD)와 검량한계(LOQ)를 구하기 위해서 다음과 같은 방정식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{LOD} = 3.3 \times \sigma / S$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma / S$$

여기서 σ 는 반응의 표준편차를 의미하고 S는 검량선의 기울기를 뜻한다.

정확성은 표준품들이 섞인 용액을 4개의 농도에서 피크의 면적비로 계산하였으며, 정밀성으로 각 농도의 inter-day와 intra-day 변화를 계산하였다. 각 화합물의 정확성은 4번에 걸친 실험으로 계산하였다.

이미 밸리데이션이 되었다고 생각하는 추출 방법이었기 때문에 full validation은 하지 않고 직선성, 정확성, 정밀성에 대한 밸리데이션을 수행하였다⁷².

Part 2. SPE와 연계된 DLLME-SFO를 이용한
sildenafil과 그 유사물질 분석

2. 기기 조건

- HPLC-UV system

Column oven - 40 °C

Flow rate - 1.2 mL/min

Mobile phase - A: 0.1% phosphoric acid/ 0.1% sodium
hexanesulfate, B: 95% Acetonitrile

Injection volume - 20 μ L

Gradient condition - 70% solvent A (0 min), 45% solvent A
(15 min), 0% solvent A (28 min), 70% solvent A (31 min)
and 70% solvent A (35 min)

UV wavelength - 225, 291 nm

3. 샘플 제조

사용된 sildenafil과 5가지 sildenafil 유사물질들인 hongdenafil(acetyldenafil), homosildenafil, udenafil, benzyildenafil, thiosildenafil(Fig 3)은 모두 0.1 mg mL^{-1} 의 농도로 MeOH에 녹여서 냉장고에 보관하였다. 사용할 때는 만들어 놓은 stock을 바로 MeOH로 희석하여 사용하였으며, 정량을 위한 검량선을 만들 시엔 6개의 농도로 $5 \mu\text{L}$ 를 취해서 matrix로 사용된 500 mg의 영양제에 넣어 상온에서 완전히 말린 뒤 추출하였다. 추출할 시엔 20 mL MeOH를 넣고 20 분간 sonication하는 방법을 사용하였으며, 추출 뒤 용액을 2500 rpm으로 원심 분리하고 그 상정액을 취하고 유리 플라스크에 옮겨 감압증류를 통해 완전히 건조시켰다. 마지막으로 남은 잔존물을 0.1% formic acid가 들어 있는 10 mL 10% MeOH로 다시 녹여서 $0.5 \mu\text{m}$ PTFE 실린지 필터를 사용해 여과하면 SPE를 할 수 있는 이전 단계는 끝난다. SPE가 들어가기 이전에 여과 과정을 거치고 용매를 바꾸어 주는 이유는 여과를 하지 않을 경우 SPE 상에서 제대로 추출이 되지 않는 경우가 많았고 기본적으로 mixed mode라 해도 역상이기 때문에 용매를 극성으로 바꾸어 줄 필요성이 있었다.

다른 식이보조제를 적용하기 위해, 중국에서 들여온 샘플을 추출하기 위해선 다른 방법을 써야 했다. 일단 50 mg의 샘플을 가지고

20 mL MeOH을 역시 20 분간 sonication한 뒤 원심 분리하여 (2500 rpm), 1 mL의 상정액을 0.1%가 들어 있는 10% MeOH로 100배 희석하고 그 중 10 mL만 취해서 마찬가지로 여과한다. 이렇게 하는 이유는 실제 중국에서 온 식이보조제에서 너무나 많은 함량의 첨가물이 검출되었기 때문에 SPE와 DLLME로 추출하는데 있어 너무나 과량이었기 때문에 줄이고자 희석 하였다.

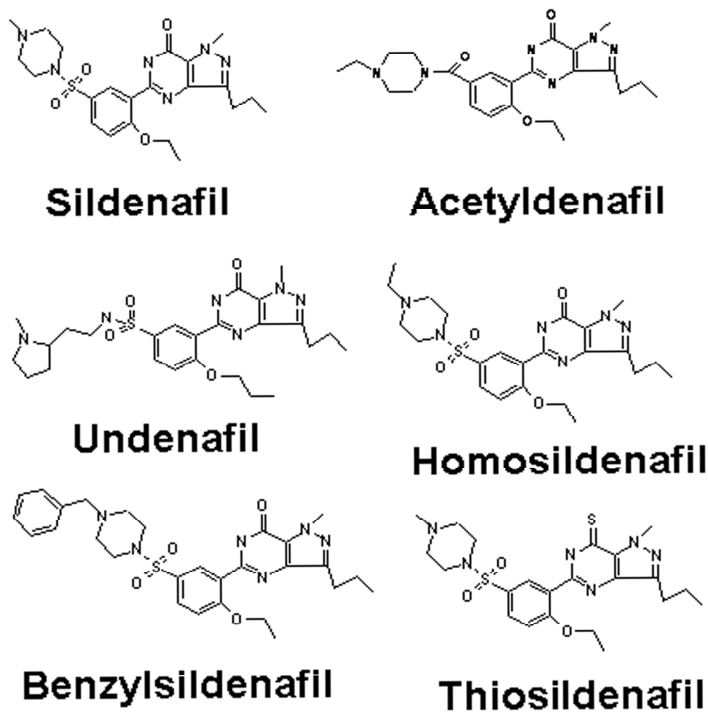


Figure 3. Sildenafil and its five analogues

4. Solid phase extraction

SPE를 할 때 사용한 SPE cartridge는 Waters 사의 Oasis MCX SPE cartridge로 사용하기 전에 3 mL MeOH와 3 mL 물, 3 mL 5mM KH_2PO_4 용액을 사용해 내부 충전제를 세척하고 활성화 시켰다. 제조된 샘플 10 mL을 투입한 뒤 SPE 내부의 물질을 제거하기 위해 3 mL MeOH로 세척하였으며 내부에 원하는 물질을 얻기 위해서 5% ammonia가 들어 있는 MeOH 용액 1 mL을 써서 용출시켰다. 이 방법은 모두 Waters사에서 제공한 지침서를 따라서 이용하였다.

5. Dispersive liquid-liquid extraction on solidification of floating organic droplet

DLLME-SFO를 위해서 SPE에서 나온 용액을 dispersive 용매로 보고 시도하였다. 추출 용매는 50 μL 1-dodecanol을 사용하였으며 일단 추출용매와 dispersive 용매를 섞는다. 그 후 1M Tris-HCl buffer pH 8.8 5 mL을 12 mL 짜리 유리 시험관에 넣고 섞인 용매를 1 mL 짜리 주사기에 넣은 다음 바늘이 수중인 상태에서 강하게 쏘아낸다. 쏘아낸 섞인 용매가 분산되어 불투명한 상태의 용액이 관찰되면 짧게 흔든 뒤 분산된 용매를 다시 합치기 위해서 3500 rpm에서 5 분의 원심 분리를 통해서 유기용매와 수용액으로 다시 분리시킨다. SFO이기 때문에 유기용매방울이 수면 위로 생성되어 있을 텐데, 이 용매방울을 고체화시키기 위해서 유리 시험관을 간 얼음 속에 넣고 10 분 정도 기다리면 고체화 된다. 고체화된 방울을 제조한 기구를 통해서 1.7 mL Ependorff 튜브로 옮긴 뒤 묻어 있는 물과 유기용매를 분리하기 위해 12000 rpm에서 1 분 정도 원심 분리 하고 유기 용매인 위층을 30 μL 수거하여 60 μL MeOH와 혼합하여 HPLC-UV system에 주입한다. MeOH와 혼합하는 것은 1-dodecanol이 매우 점성이 강하여 주입하기가 어렵기 때문에 MeOH와의 혼합은 이러한 경향을 줄여 주입하기에 용이했

다.

6. 밸리데이션

사용한 SPE-DLLME-SFO 방법을 검증하기 위하여 직선성, 정밀성과 민감도를 측정하였다. 직선성을 확보하기 위해서 matrix 효과를 제거하기 위해서 standard addition method를 사용하여 5, 10, 20, 40, 100 ng mL⁻¹의 여섯 개의 농도 점을 선택하여 3번씩 결과를 보고 검증하였다. Inter-day와 Intra-day variation을 측정하기 위해선 낮은 농도(5 ng mL⁻¹, acetildenafil만 10 ng mL⁻¹), 중간 농도(20 ng mL⁻¹), 높은 농도 (100 ng mL⁻¹)로 역시 3번씩 결과를 보고 얻어서 상대표준편차(Relative standard variation)을 퍼센트로 얻어서 구하였다. 검출한계(LOD)와 검량한계(LOQ)는 각각 기준선 Noise의 최소 세 배의 높이를 LOD로 하였고, LOQ는 RSD%가 15이내인 최소 농도를 가지고 LOQ를 정하였다⁷³.

Ⅲ.결과 및 고찰

Part 1. UPLC/Q-TOF를 이용한 PDE-5 inhibitor 와 sibutramine 및 그 유사물질의 동시 분석

1. 크로마토그램(XIC)과 분자량의 정확도

Figure 4 에서 6개 화합물이 동시에 분석되는 것을 보여주고 있다.

화합물의 머무름 시간은 vardenafil 6.5 분, sildenafil 7.4 분, N,N-didesmethylsibutramine 8.8 분, N-desmethylsibutramine 9 분, sibutramine 9.2 분, tadalafil 9.3 분의 순으로 나타났다. 총 분석시간은 13분으로 다른 mass로 했을 때보다 절반 정도 줄인 시간이다³.

Table 1에서는 6개 화합물의 계산되어진 m/z 값과 Q-TOF MS에서 측정된 값 및 그 오차를 보여주고 있다. 화합물의 분자량의 오차는 모두 5 ppm이하였다. 높은 분자량의 정확도로 인해 각 화합물의 분자량을 쉽게 결정할 수 있었다. 보통, 원소 배치(isotopic distribution)로 화합물의 분자식을 확인하는데 받아들일 수 있는 오차가 5 ppm이며, 이 정도의 질량검출기와 각자 가지고 있는 특이

한 머무름 시간으로 매우 높은 정확도로 물질을 특정 지을 수 있다

61.

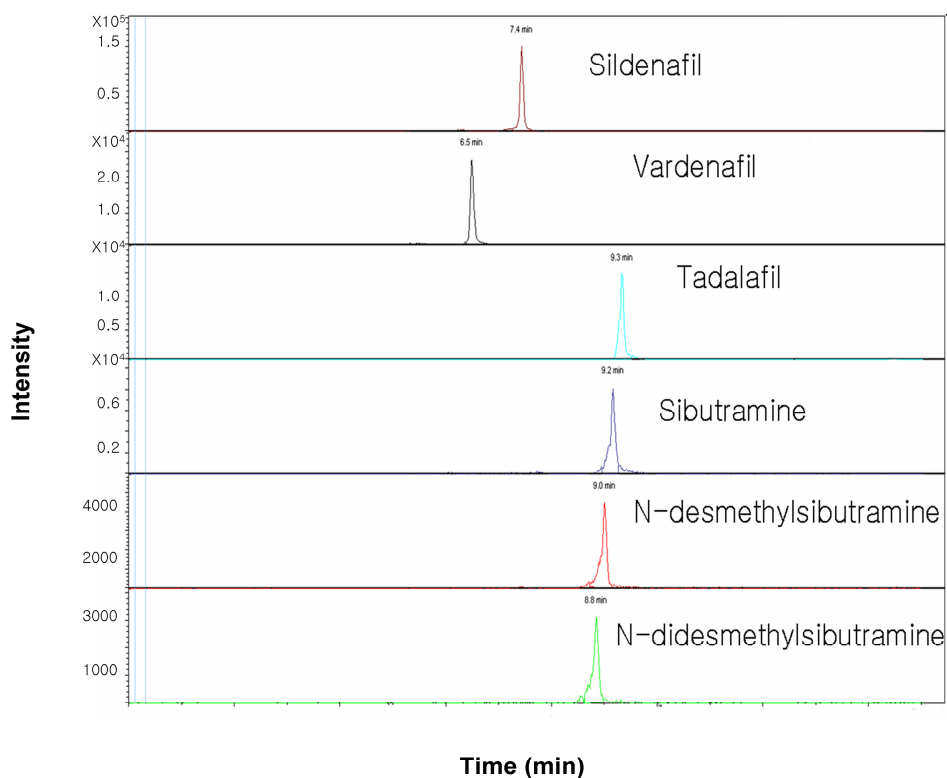


Figure 4. Extract ion chromatogram of the six compounds. All compounds concentration was 40 $\mu\text{g/g}$. Extracted ion molecular weight were sildenafil (m/z 475.21), vardenafil (m/z 489.23), tadalafil (m/z 390.14), sibutramine (m/z 280.18), N-desmethylsibutramine (m/z 266.17), N,N-didesmethylsibutramine (m/z 252.15)

Compounds	Theoretical Mass [m/z]	Calculated Mass [m/z]	Error(ppm)
Sildenafil	475.2122	475.2122	+0.1
Vardenafil	489.2278	489.2284	-1.1
Tadalafil	390.1448	390.1400	+4.9
Sibutramine	280.1826	280.1838	-3.9
N-desmethylsibutramine	266.1670	266.1668	+0.7
N,N-didesmethylsibutramine	252.1513	252.1518	-1.8

Table 1. Calculated and measured m/z of the six compounds

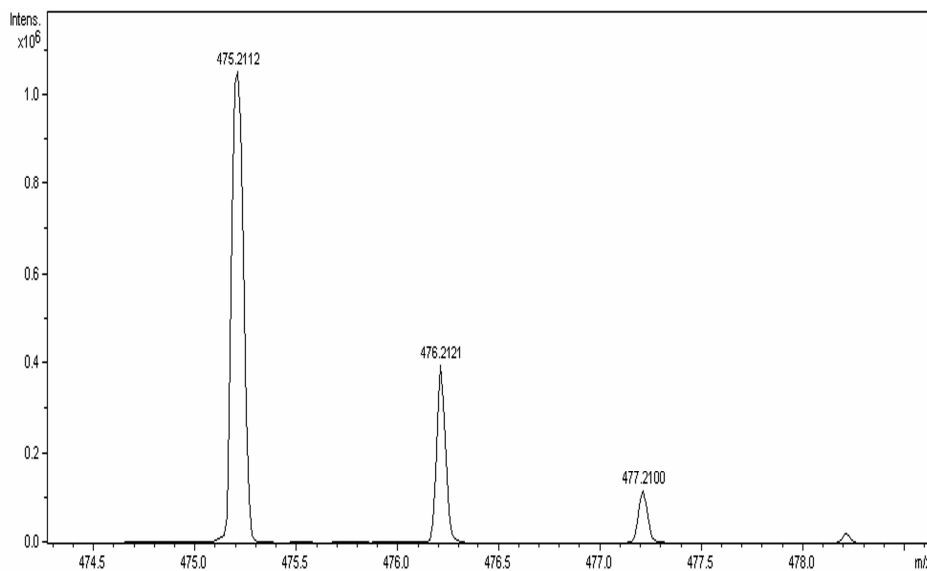
2. Isotopic distribution

Isotopic distribution은 화합물 속에 있는 원소의 동위원소를 이용하여 그 비율로 화합물의 분자식을 유추하는 방법이다. Q-TOF MS가 지닌 정확한 분자량을 통하여 물질의 분자식을 표준 품과 비교 없이 식별하고자 하였다. 그럼에도 불구하고 sildenafil, vardenafil, tadalafil의 경우에는 탄소, 산소, 질소, 수소, 황만으로 이루어져서 많은 분자식과의 연관이 있었다(Figure 3). 하지만 분자식 중 가장 높은 신뢰성을 나타낸 식은 그들의 분자식으로 나타나 5 ppm이 아닌 더 정확한 분자량을 지닌 mass라면 화합물을 식별하는데 매우 유용하게 쓰일 수 있을 것으로 기대된다. 물론 더 이 기계를 기계적으로 업그레이드 하여 오차를 줄일 수 있는 방법 이외에 다른 방법을 거쳐서 오차를 줄일 수 있겠지만, 이 물질들에 대해서는 5 ppm의 오차가 발생하는 것을 피할 수 없는 것으로 보인다.

반면, sibutramine과 그 유사체들은 단 한 개의 분자식만을 확인하였고 실제 그 분자식과 실제 화합물의 분자식이 일치하였다. 이것은 sibutramine과 그 유사체들이 탄소, 산소, 질소, 수소가 아닌 염소를 가지고 있는 화합물이었기 때문으로 생각되며 이 Q-TOF MS의 정확한 mass에 의거하여 탄소, 산소, 질소, 수소, 황 이외의 다른 원소를 지니고 있는 화합물이라면 그 분자식을 정확히 찾아낼

수 있을 것으로 기대된다.

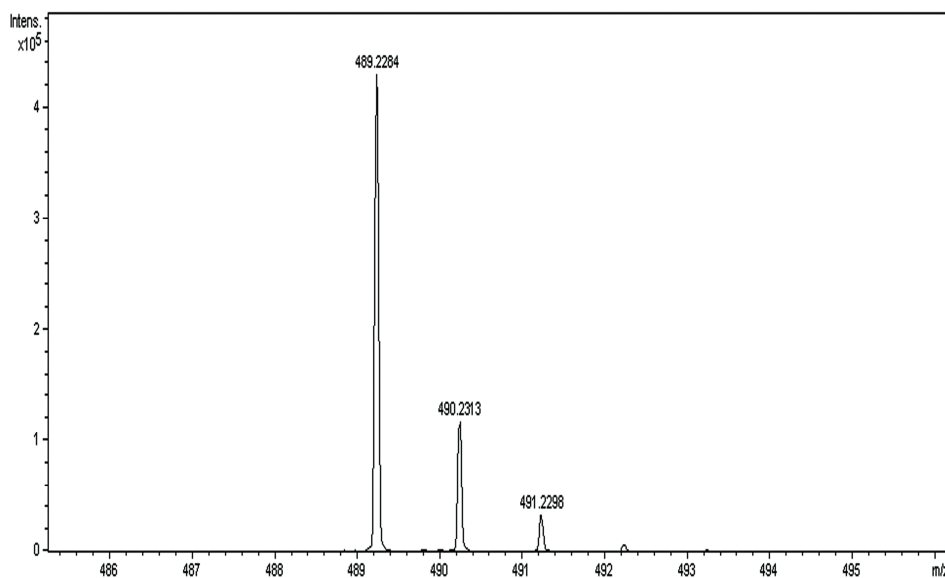
a)



measure m/z	#	Formula	m/z	Error[mDa]	Error[ppm]
475.2112	1	C22H31N6O4S	475.2122	1.0	2.0
	2	C21H35N2O8S	475.2109	-0.4	-0.9
	3	C18H27N12O2S	475.2095	-1.7	-3.6

Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. a) Sildenafil isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

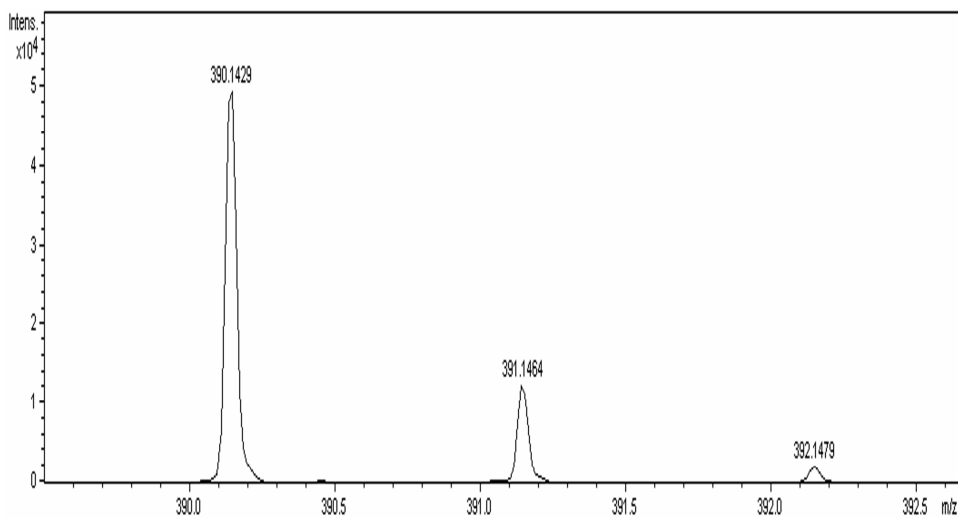
b)



measure m/z	#	Formula	m/z	Error[mDa]	Error[ppm]
475.2284	1	C23H33N6O4S	479.2278	-0.6	-1.1
	2	C22H37N2O8S	479.2265	-1.9	-3.8
	3	C24H29N10S	479.2292	0.8	1.7
	4	C19H41N2O8S2	479.2299	1.5	3.1
	5	C23H41N2O3S3	479.2274	-1.0	-2.0
	6	C31H37OS2	479.2280	-0.3	-0.7

Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. b) Vardenafil isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

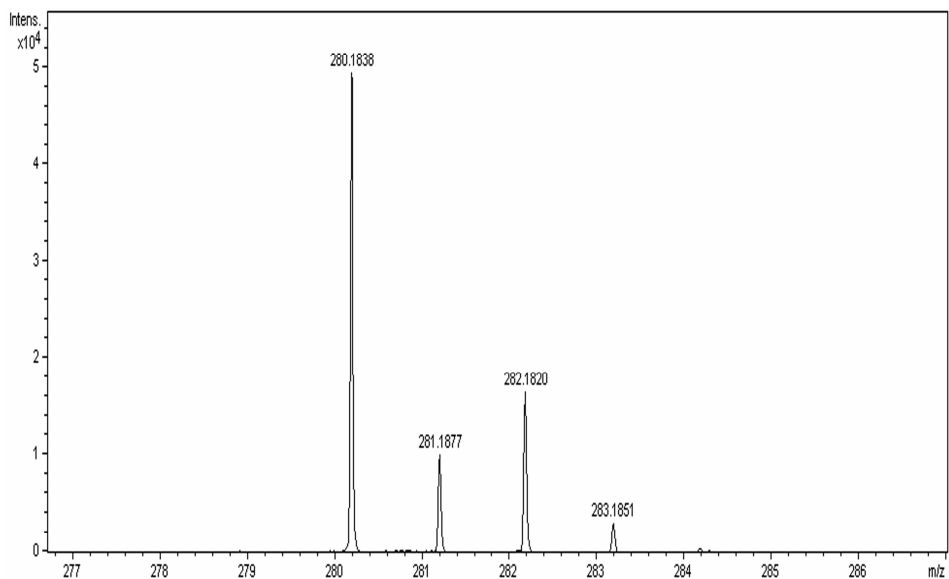
c)



measure m/z	#	Formula	m/z	Error[mDa]	Error[ppm]
390.1429	1	C22H20N3O4	390.1448	1.9	4.9
	2	C23H16N7	390.1462	3.3	8.4
	3	C18H16N9O2	390.1421	-0.8	-2.0
	4	C17H20N5O6	390.1408	-2.1	-5.4
	5	C16H24NO10	390.1395	-3.4	-8.8

Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. c) Tadalafil isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

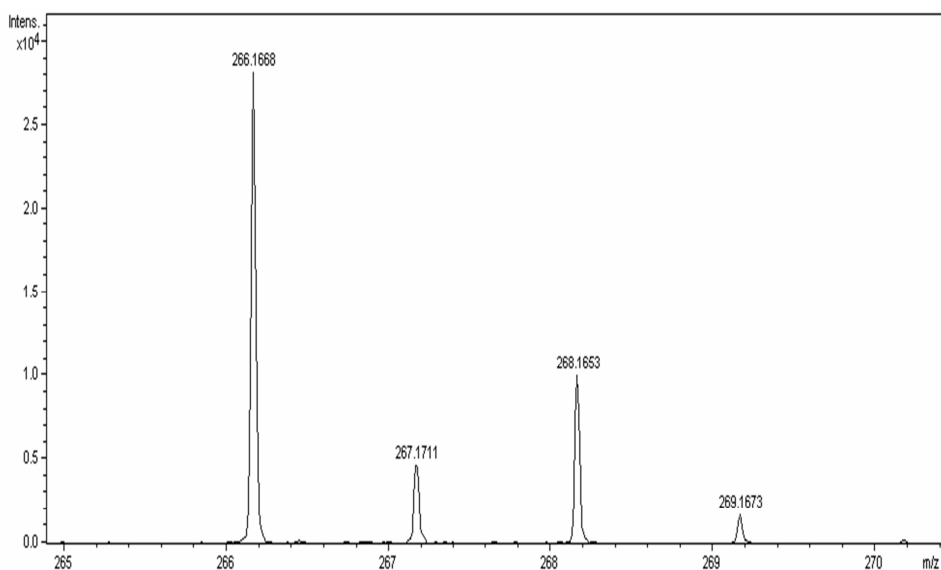
d)



measure m/z	#	Formula	m/z	Error[mDa]	Error[ppm]
266.1668	1	C16H25ClN	266.1670	0.2	0.7

Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. d) Sibutramine isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

e)



measure m/z	#	Formula	m/z	Error[mDa]	Error[ppm]
280.1838	1	C17H27ClN	280.1827	-1.1	-3.9

Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. e) N-desmethylsibutramine isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

f)

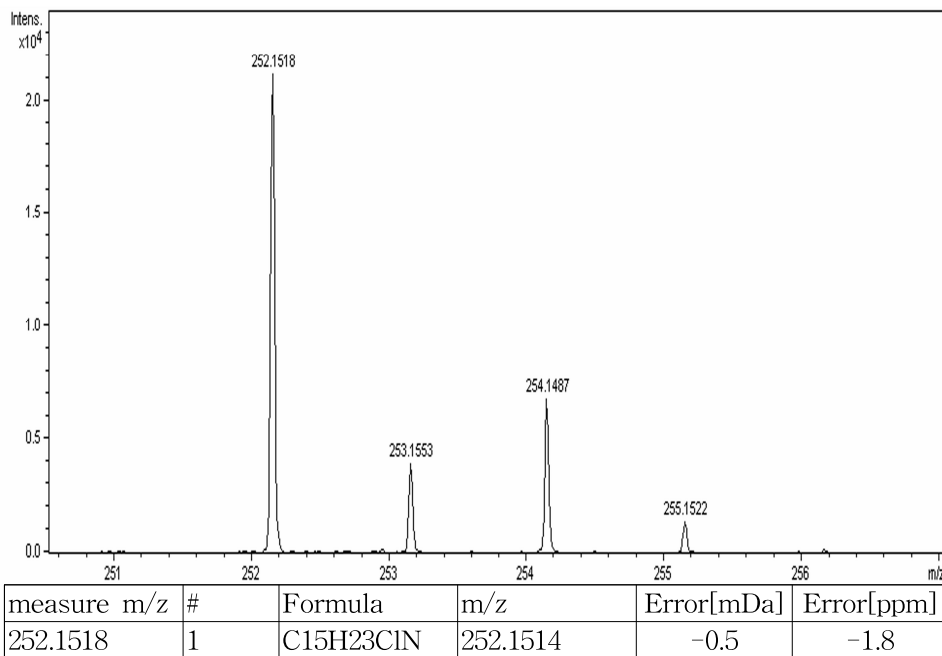


Figure 5 Isotopic distribution results of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. f) N,N-didesmethylsibutramine isotopic mass spectrum and candidates of isotopic distribution.

3. MS/MS fragmentation

Isotopic distribution으로는 정확하게 분자식을 추정해 낼 수 없는 물질이 상당 수 있었기 때문에 화합물의 $[M+H]^+$ 를 확인하고 그 분자의 mass fragmentation을 확인하였다. 기존에 알려진 fragmentation^{28,74,75}과 비교하여 그 물질이 모두 sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine, N-desmethylsibutramine, N,N-didesmehtylsibutramine임을 확인하였다.(Figure 6)

a)

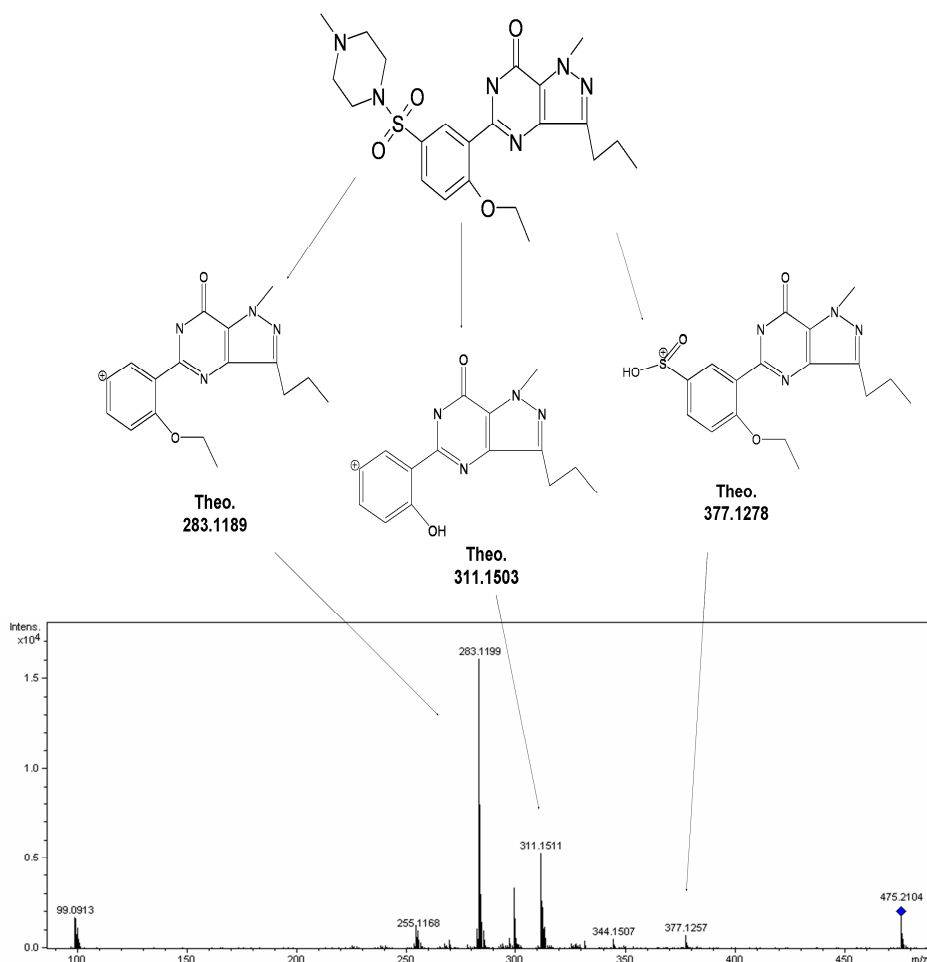


Figure 6 Mass fragments of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. Collision energy was 10 eV except for sildenafil and vardenafil. In case of sildenafil and vardenafil, 30 eV energy could obtain a fragment for identification of the structure. a) sildenafil and its predicted fragments mass

b)

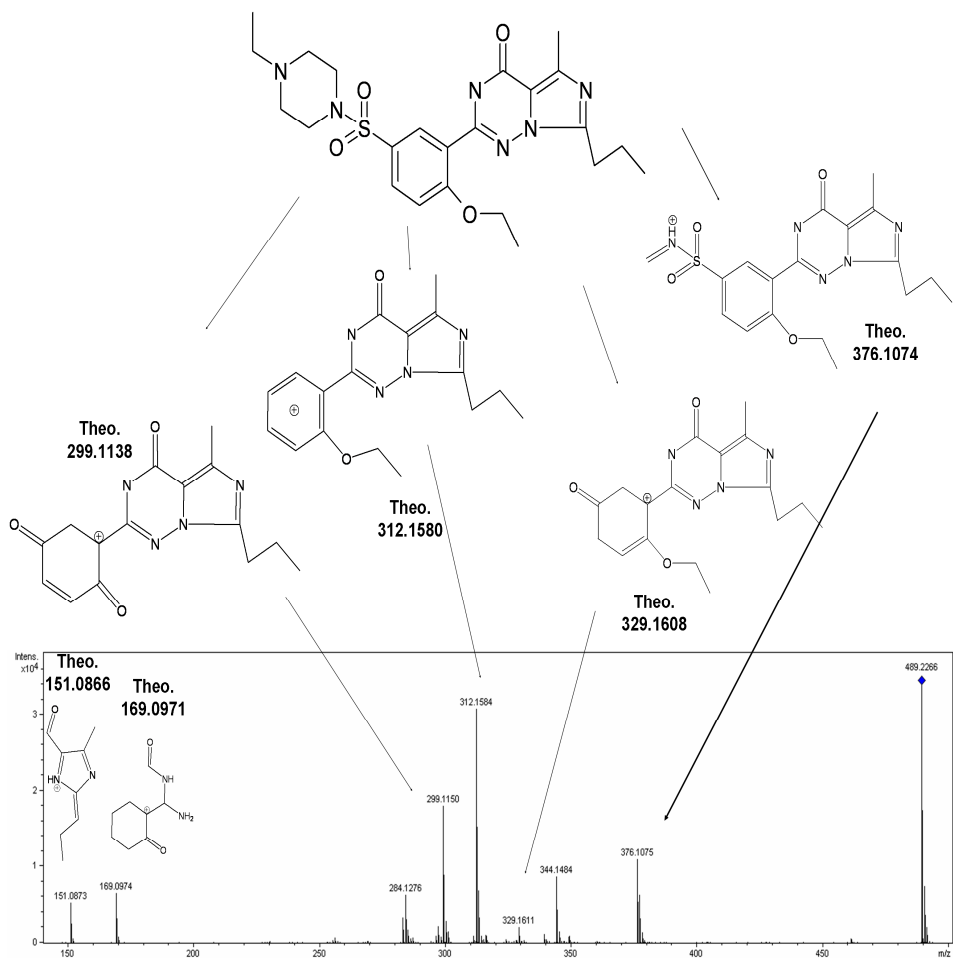


Figure 6 Mass fragments of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. Collision energy was 10 eV except for sildenafil and vardenafil. In case of sildenafil and vardenafil, 30 eV energy could obtain a fragment for identification of the structure. b) vardenafil and its predicted fragments mass

c)

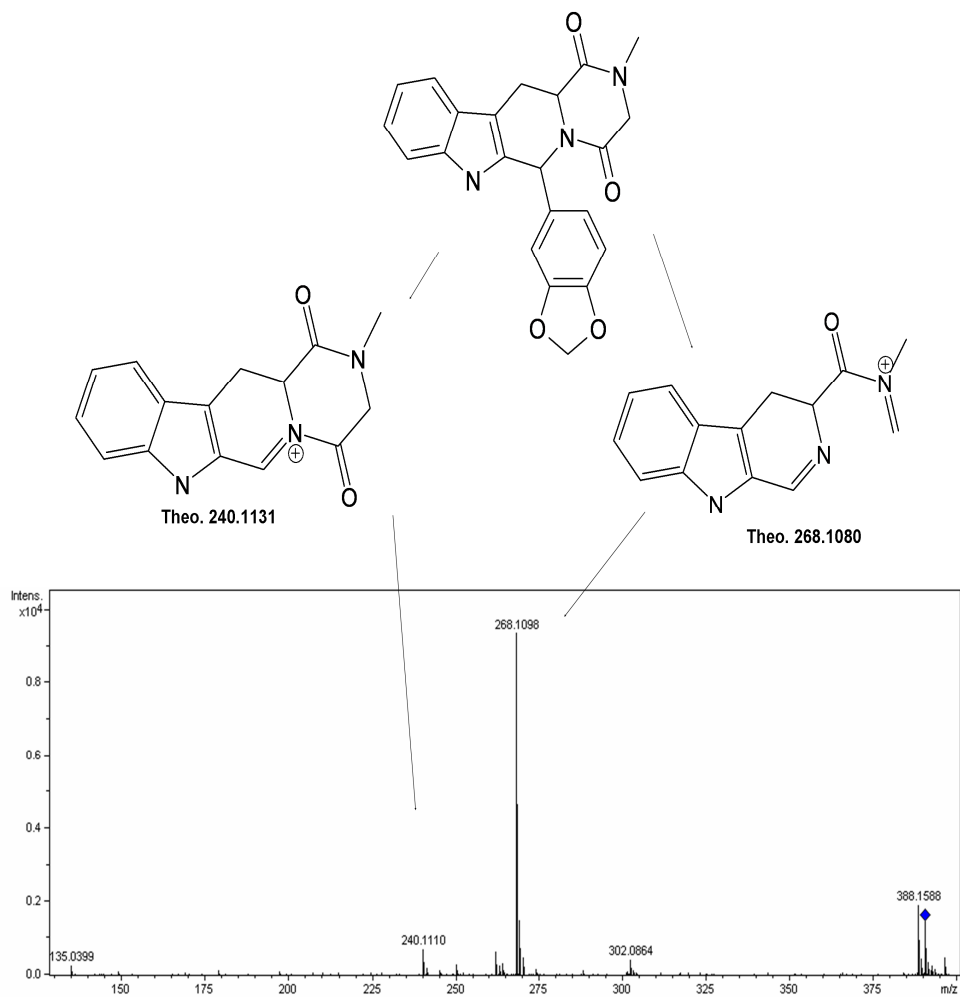


Figure 6 Mass fragments of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. Collision energy was 10 eV except for sildenafil and vardenafil. In case of sildenafil and vardenafil, 30 eV energy could obtain a fragment for identification of the structure. c) Tadalafil and its predicted fragments mass

d)

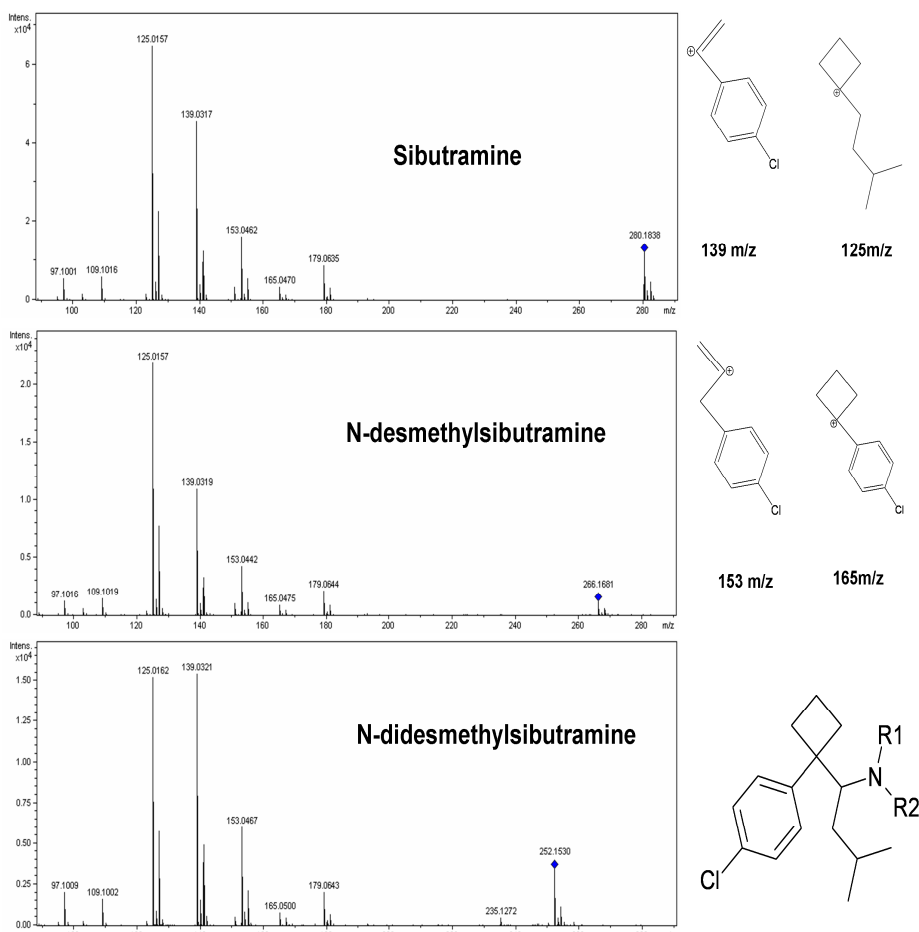


Figure 6 Mass fragments of sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine and its two analogues. Collision energy was 10 eV except for sildenafil and vardenafil. In case of sildenafil and vardenafil, 30 eV energy could obtain a fragment for identification of the structure. d) sibutramine, its two analogues and their predicted fragments mass

4. 밸리데이션

모든 화합물의 직선성은 R 제곱 값을 통해 구하였는데 모두 0.9904 이상이었다. 직선성 범위는 2 - 40 $\mu\text{g g}^{-1}$ 이었으며 LOD와 LOQ 값은 Table 2 에서 나타났었다. Inter-day와 Intra-day를 통한 정밀도는 피크 면적의 상대표준편차를 통해 구하였으며, 6개의 화합물의 결과 모두를 Table 3에 기재하였고 정확성 또는 같이 기재하였다.

Compounds	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Sildenafil	0.44	1.35
Vardenafil	1.25	3.80
Tadalafil	2.00	6.07
Sibutramine	1.78	5.39
N-desmethylsibutramine	1.50	4.55
N,N-didesmethylsibutramine	1.92	5.84

Table 2 LOD and LOQ of the six compounds.

Known concentration ($\mu\text{g/g}$)	Concentration ($\mu\text{g/g}$, mean \pm S.D)	Variation (RSD %)	
		Intra-day	Inter-day
Sildenafil			
2	2.1 \pm 0.1	1.4	2.7
10	n.d.	2.0	4.2
20	20.5 \pm 0.8	1.7	3.3
40	40 \pm 1.5	2.6	2.9
Vardenafil			
2	2.3 \pm 0.3	3.9	8.3
10	n.d.	3.8	4.4
20	20 \pm 0.9	1.0	3.4
40	40 \pm 1.3	1.8	3.6
Tadalafil			
2	2.2 \pm 0.2	8.6	3.6
10	n.d.	5.1	4.2
20	20 \pm 1.7	4.0	2.0
40	40 \pm 2.0	2.2	3.9
Sibutramine			
2	2.1 \pm 0.2	7.0	3.4
10	n.d.	4.3	3.8
20	20 \pm 2.1	4.0	2.0
40	40 \pm 3.3	2.6	2.5
N-desmethylsibutramine			
2	2.0 \pm 0.1	4.4	5.5
10	n.d.	6.0	3.7
20	20 \pm 2.1	5.8	5.7
40	40 \pm 3.3	2.6	2.5
N,N-didesmethylsibutramine			
2	2.0 \pm 0.2	11.3	12.8
10	n.d.	5.9	9.8
20	20 \pm 1.2	6.3	6.7
40	40 \pm 2.1	3.6	5.0

Table 3. Accuracy and precision. n.d., no data

5. 실제 샘플 적용

50개의 건강보조식품을 인터넷 시장을 통해 구매하여 sildenafil, vardenafil, tadalafil, sibutramine, N-desmethylsibutramin, N,N-didesmehtylsibutramine에 대한 분석을 실시하였다. 그 결과 3종의 건강보조식품에서 대상물질이 검출되었다. 11.1 mg/ unit, 47.8 mg/ unit의 tadalafil과 9.4 mg/ unit의 N-desmethylsibutramine이 검출된 건강보조식품은 모두 캡슐 형태로, 이는 가장 만들기 쉽고 첨가가 간단하기 때문이라고 생각된다.(Fig 7)

보통 치료를 위한 tadalafil의 함량은 10-20 mg 사이에 위치하는데 한 제품은 그 양의 2배를 넘었기 때문에 매우 위험한 부작용을 경험할 것이라 생각되고, sibutramine 및 그 계열 화합물들은 유럽과 미국, 그리고 최근 우리나라까지 모두 제품 생산 금지 및 회수 조치가 내려진 상태이므로 역시 심혈관계 부작용을 일으킬 거라 예상된다.



Tadalafil 11.1 mg/unit



Tadalafil 47.8 mg/unit



N-didesmethylsibutramine 9.4 mg/unit

Figure 7 Adulterated supplements among the collected 50 supplements. N-desmethylsibutramine and tadalafil were detected.

Part 2. SPE와 연계된 DLLME-SFO를 이용한 sildenafil과 그 유사물질 분석

1. Ion pairing chromatography를 이용한 주요 성분 분리

목표로 한 6개 화합물이 모두 sildenafil 관련해서 약간의 변형을 거친 유사물질이기 때문에 UV 흡광도도 유사하여 머무름 시간만으로 분리해야 되기 때문에 ion-pairing chromatography를 사용하여 분석하였다. 두 가지(머무름 시간, m/z)를 가지고 분리 분석할 수 있는 LC-MS와는 다르기 때문에 LC-UV로 분석하면 상당히 많은 방해되는 peak이 나올 수밖에 없다. 이 peak들과 실제 성분 peak이 겹치는 것을 최소화하기 위하여 여기서는 sodium hexanesulfonate를 ion-pairing reagent로 사용하였다. Fig 8에서 볼 수 있듯이 sildenafil과 5개의 유사물질들이 잘 baseline에서 잘 분리되어 15 min 내 나오는 것을 확인할 수 있다.

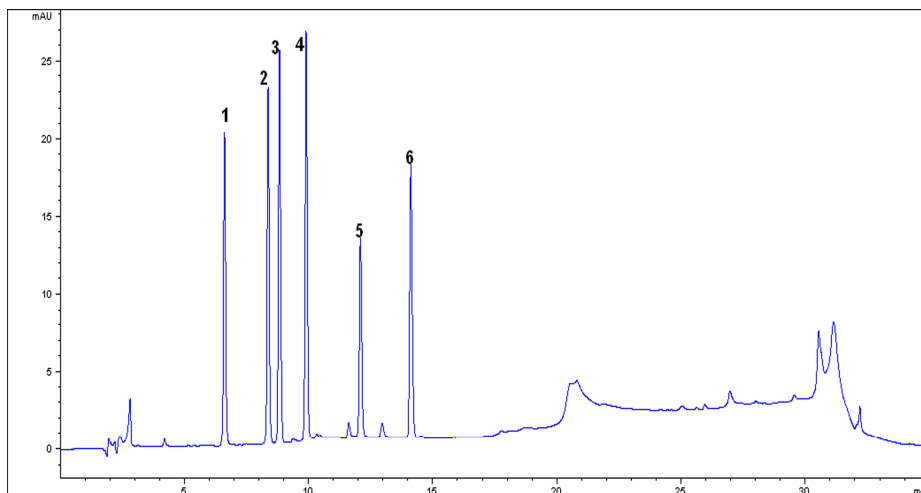


Figure 8. UV chromatogram of sildenafil and its five analogue. 1- acetildenafil 2-sildenafil 3- homosildenafil 4-udenafil 5-benzylsildenafil 6- thiosildenafil

2. SPE 최적화

DLLME-SFO를 하기엔 샘플에 있는 물에 녹지 않는 고형물이 많고, 조금 더 농축시키기 위하여 SPE를 시도하였다. 많이 사용되는 SPE cartridge인 C18을 가지고 시도해 보았으나 그 경우엔 원하는 물질을 추출하지 못하고 많은 peak들이 나타나 부적합한 것으로 나타났다. 게다가 그 뒤 DLLME-SFO에서 많은 방해물로 인하여 DLLME-SFO할 때 생성되어야 하는 방울이 생성되지 못하는 문제점도 보였다. 그래서 C18보다 더 나은 cartridge를 찾던 중 Waters사의 Oasis MCX cartridge에 주목하게 되었다. 이 cartridge는 mixed-mode로 역상과 양이온 교환 크로마토그래피를 동시에 적용할 수 있는 충전제를 채웠기 때문에 중성에서 양이온이 되는 sildenafil과 그 유사물질을 추출하기에 적당하며, 그 외의 중성에서 극성을 띠지 않는 물질을 제거하는데 있어 탁월한 효과를 보여줄 것으로 기대하였다. 더욱이 매우 간단한 용매인 MeOH로 세척하는 것으로 방해물질을 쉽게 없앨 수 있어서 더 유용하다고 판단하였으며 실제 사용했을 때 강력한 제거 효과를 보여주었다.(Fig 9)

a)

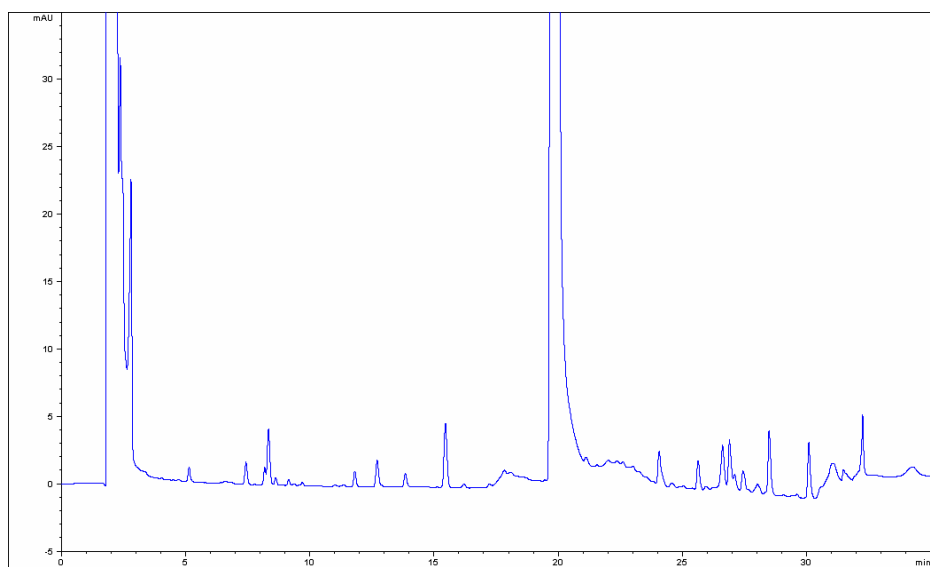


Figure 9. UV chromatogram before and after mixed mode SPE-DLLME-SFO. a) UV chromatogram before mixed mode SPE-DLLME-SFO

b)

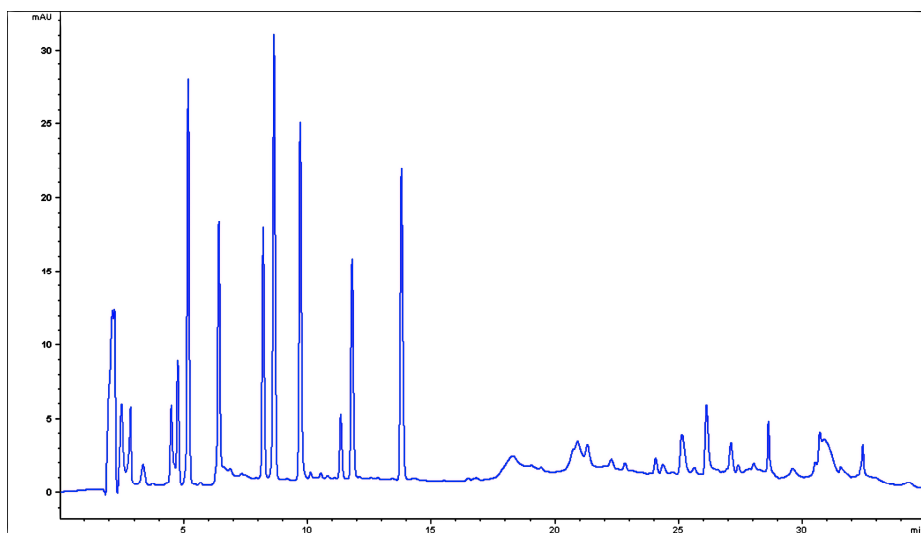


Figure 9. UV chromatogram before and after mixed mode SPE-DLLME-SFO.

b) UV chromatogram after mixed mode SPE-DLLME-SFO

3. DLLME-SFO 최적화

사용된 DLLME-SFO 방법을 최적화하기 위하여 추출 용매, dispersive 용매, 추출용매의 양, 수용액의 pH를 가장 중요한 요인으로 정하여 최적화하기로 하였으며, 최적화할 때 사용할 지표로 enrichment factor라는 것을 이용하였다. Enrichment factor는 추출된 다음의 농도/ 처음 농도라는 식으로 계산하였다.

먼저 추출용매와 dispersive 용매의 종류를 선택하기 위하여 몇 가지 종류의 사용되는 것을 시험했다. DLLME-SFO에 적합한 용매는 모두 물보다 비중이 작아야 하며, 물에 잘 녹지 않아야 하고, 녹는 점이 상온 근처여야 하며, 대상 물질을 추출하기에 적합한 것이어야 한다. 그리고 사용되는 dispersive 용매와 잘 섞여야 하는 용매여야 한다⁶⁸. 이러한 용매로 1-dodecanol, 2-dodecanol, 1-undecanol, hexadecane, cyclohexane 50 μ L를 1 mL MeOH를 가지고 DLLME-SFO를 시도하였다. 몇몇 용매에서 극복될 수 없는 문제가 발생하였는데, hexadecane은 MeOH와 섞이지 못했고, cyclohexane과 1-octanol은 수면 위로 생성된 방울이 낮은 녹는 점으로 인해 고체화되지 못하여 제외했다. 그래서 오직 1-dodecanol, 2-dodecanol, 1-undecanol을 대상으로 enrichment factor를 측정하였다 (Fig 10). 3가지 용매 중에서 전체적으로 좋은 추출 효율을 보여 준 것은 1-dodecanol과

1-undecanol이었으나 그 중 sildenafil, udenafil, benzylsildenafil에서 더 나은 효율을 보여준 1-dodecanol을 사용하기로 하였다. Dispersive 용매로는 1mL의 MeOH와 acetone을 가지고 시도하였는데, MeOH이 DLLME-SFO뿐만 아니라 고체 샘플 내 sildenafil과 그 유사물질을 추출하는데도 높은 추출 효율을 보여줬기 때문에 MeOH를 사용하기로 하였다. 그리고 acetone이 SPE에서 사용해야만 하는 ammonia와 상온에서 반응하여 반응물을 만드는 것이 알려져서 사용하지 않기로 했다^{76,77}.

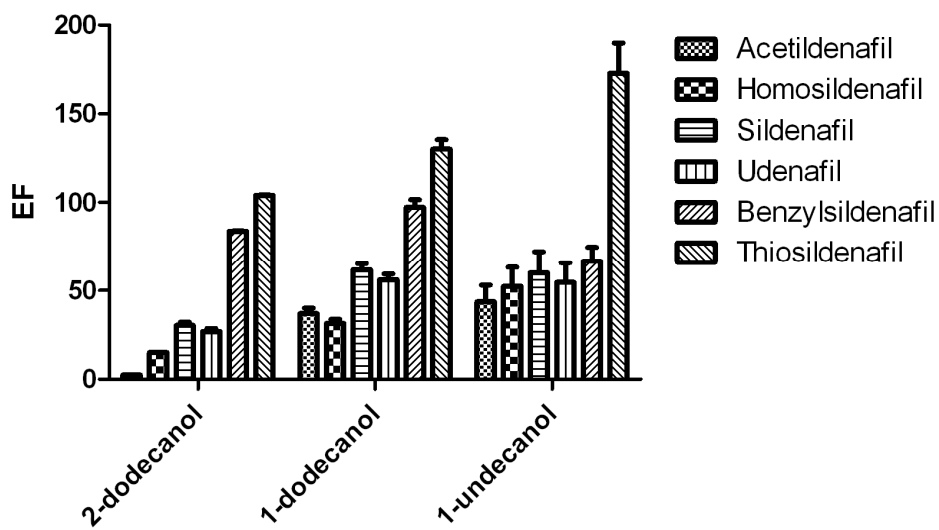


Figure 10. Extraction solvent effect on enrichment factor

용매의 용량에 대해서는 먼저 dispersive 용매의 양은 SPE에서 나온 용량인 1 mL을 변경할 수 없다. 반면, 추출용매의 양은 바꿀 수 있으므로 1-dodecanol을 사용하여 25 μ L에서 100 μ L 사이의 용량을 시험하였다. 가장 작은 용량인 25 μ L의 경우엔 고체화된 방울이 너무 작아서 꺼내기가 너무 힘들고, 100 μ L의 경우에는 enrichment factor가 너무 작아지기 때문에 추출효율이 떨어지게 된다. 그래서 결국 50 μ L의 용량으로 결정하였다.

수용액의 pH 또한 DLLME-SFO의 추출 효율을 결정하는데 매우 중요한 요인 중 하나다. sildenafil의 pKa는 8.2에서 9.6⁷⁸이고 thiosildenafil의 경우는 11.5⁷⁹로 알려져 있다. 다른 sildenafil 유사물질의 경우는 알려져 있지 않으나 같거나 비슷한 구조이기 때문에 비슷한 pKa를 가지고 있을 것으로 생각된다. 사용된 dispersive 용매에 5% ammonia가 함유되어 있기 때문에 sildenafil과 그 유사물질을 추출하는데 어려움이 있다. 샘플의 pH를 낮추기 위해서 buffer 또는 HCl을 사용해 보았다. 그러나 HCl 용액을 사용하여 pH를 조절하는 것은 매우 어려웠기 때문에 buffer를 사용하기로 하였다. Buffer를 만들기 위해 사용한 물질은 Tris (2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol)로 보통 HCl을 이용하여 그 pH를 맞추어 Tris-HCl buffer로 불린다. 이 1M Tris buffer를 사용하여 pH를 7.5에서 9.0까지 시험해 보았다(Fig

11) 그에 따르면 pH 8.5에서 thiosildenafil의 추출 효율이 제일 좋았지만 나머지 물질들은 pH 8.8이 제일 좋았기 때문에 수용액은 pH 8.8 1M Tris-Cl buffer로 결정하였다.

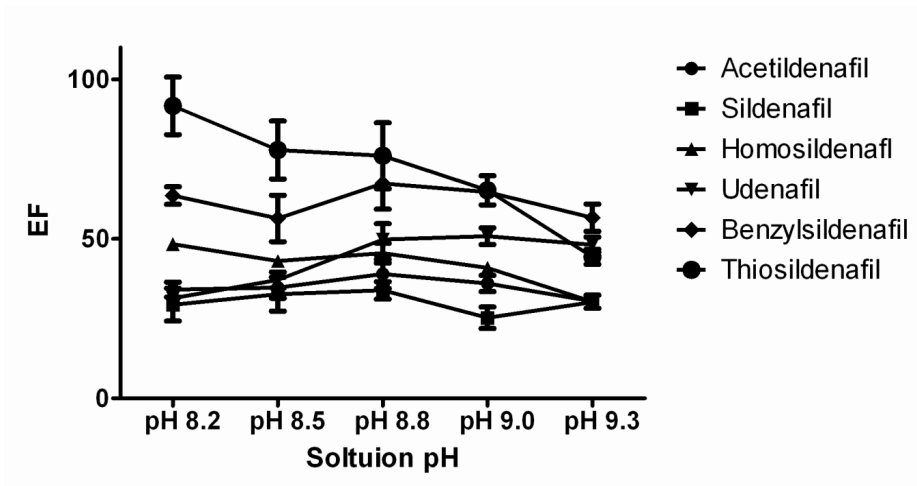


Figure 11. solution pH effect of enrichment factor

4. 밸리데이션

이 방법에서의 직선성을 계산하기 위해 표준물질을 첨가하는 방식을 사용하였고 R^2 값이 모두 0.996이상인 좋은 결과를 얻었다 (Table 4). 샘플 peak의 Inter-day 와 intra-day variation은 각각 0.2에서 5.7%, 2.2%에서 9.9%를 나타내었다 (Table 5). 검출한계 (LOD)는 2.5에서 7.5 ng mL⁻¹이었는데 타 논문 방법의 보조제 내 sildenafil, homosildenafil, acetyldildenafil의 검출한계 보다 50, 64, 19 배가 더 뛰어난 것이었다⁸⁰⁻⁸³.

	Range (ng mL ⁻¹)	R ² value	LOD (ng mL ⁻¹)	LOQ (ng mL ⁻¹)
acetildenafil	10-100	0.9993	7.5	10
sildenafil	5-100	0.9984	2.5	10
homosildenafil	5-100	0.9964	2.5	10
udenafil	5-100	0.9990	2.5	10
benzylsildenafil	5-100	0.9988	2.5	10
thiosildenafil	5-100	0.9978	2.5	10

Table 4. Linearity, R² value and sensitivity of current method

	Intra-day variation			Inter-day variation		
	Low	Medium	High	Low	Medium	High
acetildenafil	2.5	0.3	5.4	6.0	9.9	9.4
sildenafil	2.9	0.5	3.9	4.8	1.8	8.8
homosildenafil	1.8	0.2	4.3	9.0	3.1	9.1
udenafil	1.4	0.7	5.2	8.5	2.3	9.1
benzylsildenafil	1.1	2.1	5.7	7.2	2.8	9.3
thiosildenafil	1.8	0.2	4.9	5.5	2.2	9.4

Table 5. Intra- and inter-day variation of the proposed method evaluated at three concentrations. Data is shown as % RSD (n = 3). Low- 5 ng mL⁻¹(acetildenafil- 10 ng mL⁻¹), Medium- 20 ng mL⁻¹, High- 50 ng mL⁻¹

5. 사용된 DLLME와 기존 DLLME와의 차이점

이란의 Rezaee가 처음으로 DLLME를 2006년에 소개한 이후⁶⁷ 수많은 이 방법의 응용이 있어왔다⁶⁸. 그러나 실제 샘플에의 적용에서, DLLME를 적용할 때 대부분의 실제 샘플은 수용액 상태 즉 강물이나 음료 같은 것을 분석하는데 치중했다^{84,85}. 그것은 깨끗한 상태의 수용액 상태의 샘플만이 DLLME를 통해 유기용매 방울을 만들 수 있었기 때문이었다. 매우 적은 사례에서 SPE와 DLLME를 조합시켜서 고형 상태의 복잡한 샘플을 수용액 상에 녹여서 다루었다^{86,87}. 이 방식과는 다른 방식으로 물에 잘 녹지 않는 유기물들을 추출하기 위해서 고체상태의 물질을 MeOH 등의 유기용매로 먼저 녹인 후 DLLME를 시도하는 방법이 개발되었다⁸⁸. 유기용매인 추출 용매들은 DLLME에서 dispersive 용매로 이용되는 방식이다. 이러한 방식을 기존 SPE에 적용시키면, 이 방식의 약점이 enrichment factor가 낮은 부분을 높일 수 있고, SPE를 거침으로서 더 깨끗한 크로마토그램을 얻을 수 있을 것이라 생각되었다. 실제 실험에서, 사용된 영양제의 성분이 매우 복잡하고(Table 6), 첨가한 목표성분이 매우 낮았음에도 이 방법은 깨끗한 크로마토그램을 보여주었고(Fig 9), 표준물질 5 ug mL⁻¹과 20 ng mL⁻¹가 첨가되어 추출된 결과가 비슷한 intensity를 보여주는 것으로 보아(Fig 12) 방해물질 제거와 강력한 농축을 모두 이루어냈다고 판단된다.

Ingredients	Contents
Tocopheryl acetate	20 mg
Ascorbic acid	772.2 mg
Folic acid	250 µg
Thiamine nitrate	25 mg
Riboflavin	12 mg
Nicotinamide	100 mg
Pyridoxine hydrochloride	10 mg
Cyanocobalamine	12 mg
Calcium pantothenate	30 mg
Zinc sulphoxide	65.97 mg
Dry yeast containing selenium	37 mg

Table 6. The declared content of multiple ingredients in dietary supplement as matrices

a)

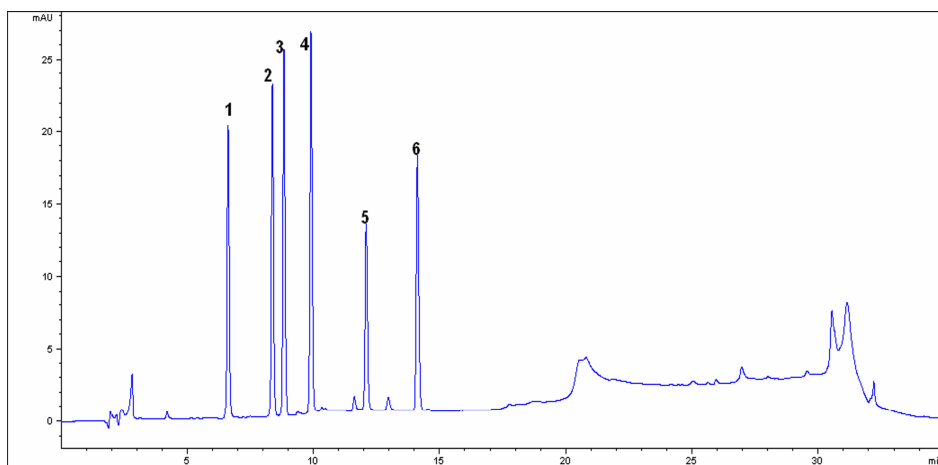


Figure 12 Effect of extraction using SPE coupled with DLLME-SFO a) The chromatogram of $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ standard solution

b)

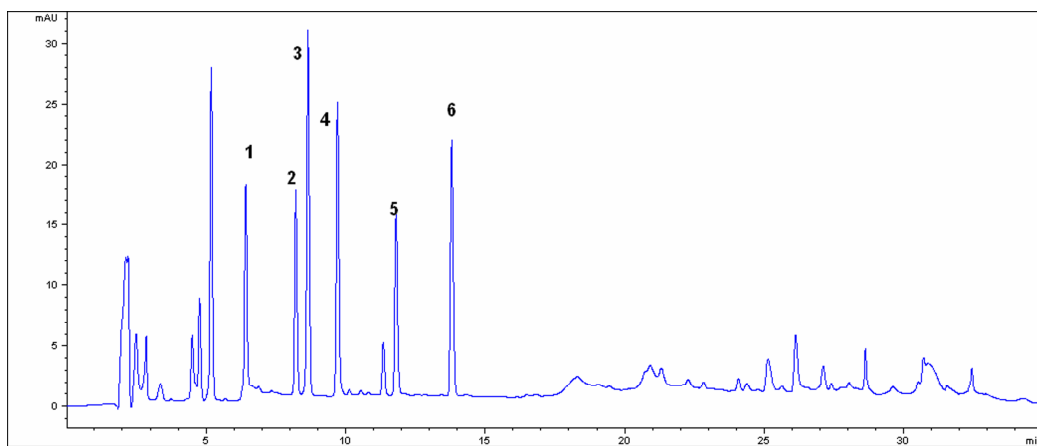


Figure 12 Effect of extraction using SPE coupled with DLLME-SFO b) The chromatogram of added 20 ng mL^{-1} solution after SPE-DLLME-SFO

6. 실제 샘플 적용

이 방법을 실제 샘플 즉 sildenafil 및 유사물질을 함유하고 있는 보조제들에게 실험하기 위해서 캡슐제, 정제, 환제의 제형을 시험했다 (Table 7).

만들어진 보조제들 속에 들어 있는 성분의 함량이 예상보다 너무 강했기 때문에 어쩔 수 없이 적은 양의 샘플을 얻고, 추출된 용액을 희석할 수밖에 없었는데, 의심되는 보조제들 속에서는 모두 sildenafil이 명확하게 검출되었다.(Fig 13) 영양제를 matrix로 한 기존 방법의 결과와 마찬가지로 sildenafil 외에 다른 peak 발생이 별로 없었다.

Formulation	Dosage	Detected compound	Compound amounts
Tablet 1	500 mg	sildenafil	10.8 mg/unit
Capsule 1	500 mg	sildenafil	46.2 mg/unit
Capsule 2	1000 mg	sildenafil	37.2 mg/unit
Tablet 2	500 mg	sildenafil	13.1 mg/unit
Pill	800 mg	sildenafil	20.9 mg/unit
Capsule 3	1000 mg	sildenafil	41.4 mg/unit

Table 7. Detected commercial dietary supplements by the developed method

a)

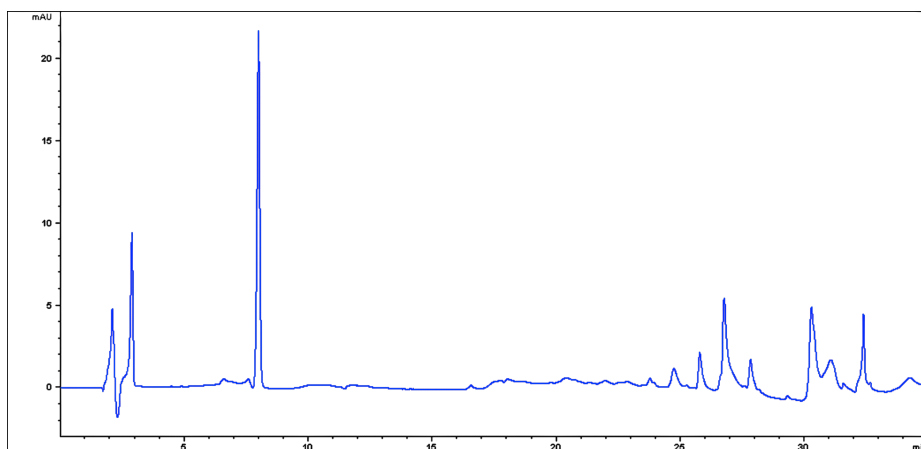


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

a) Pill formulation

b)

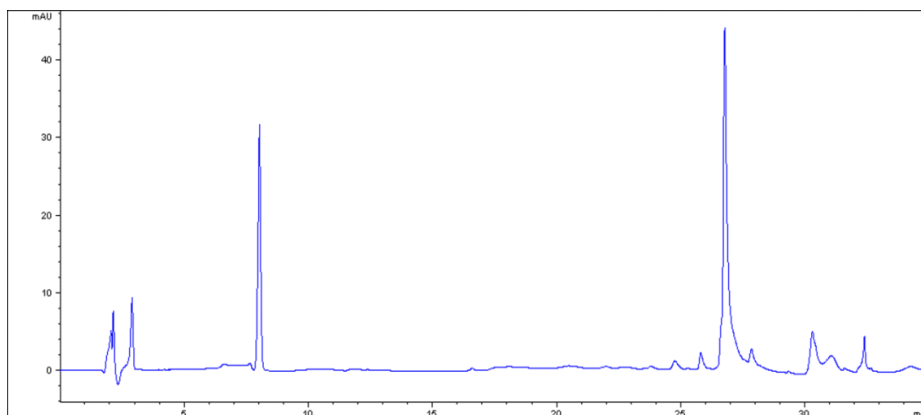


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

b) Capsule 1 formulation

c)

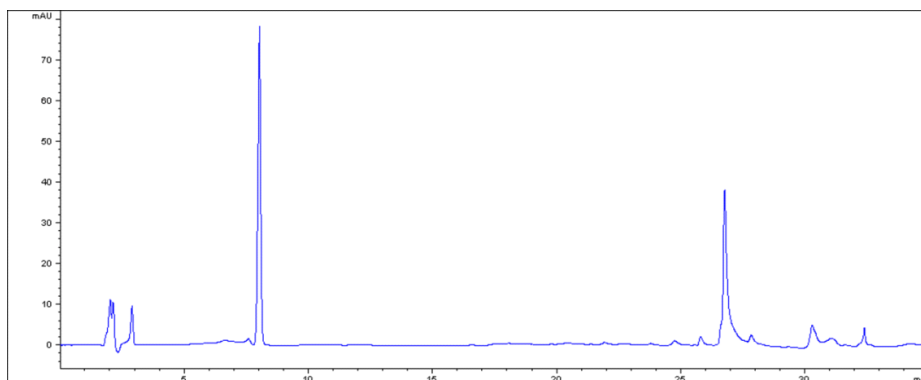


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

c) Capsule 2 formulation

d)

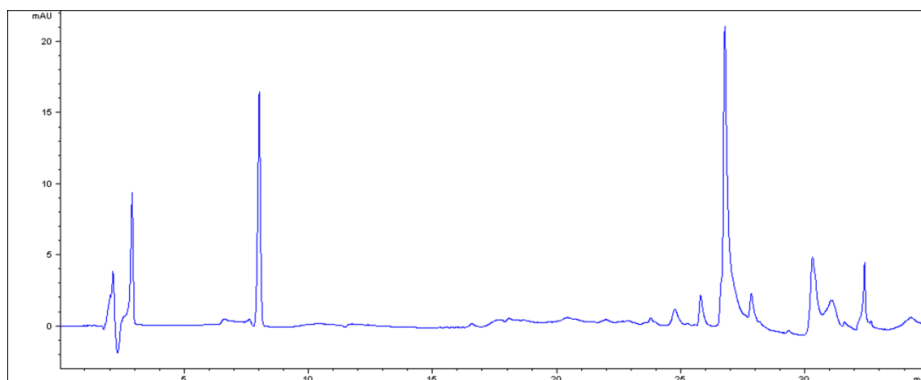


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

d) Tablet 2 formulation

e)

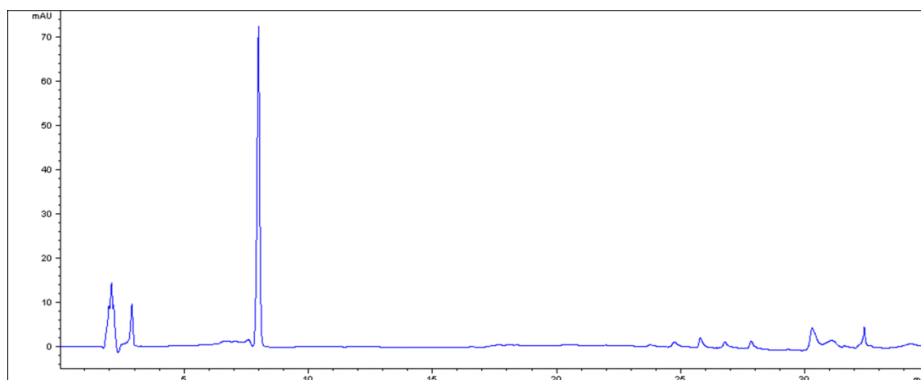


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

e) Capsule 3 formulation

f)

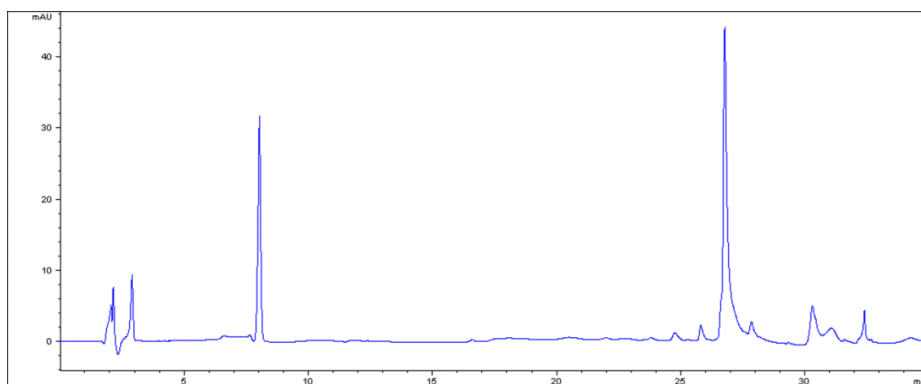


Figure 13. The Chromatogram of other adulterated supplement supplied in china using SPE-DLLME-SFO.

f) Tablet 1 formulation

IV. 결론

Part 1에서는 PDE-5 억제제로 사용되는 sildenafil, vardenafil, tadalafil과 sibutramine 과 그 유사체 들을 UPLC와 연결된 Q-TOF MS로 동시에 분석하였다. 또한 이 방법의 높은 감도와 정확도를 실제 샘플에 적용해 보았다. 이 방법은 빠르고 민감한 UPLC와 정확한 분자량을 보여주는 Q-TOF MS를 연결했으며 이는 분석 시간을 많이 줄이는 것으로 나타났다. 이 방법은 간단하고 빠르게 성기능 향상이나 체중 조절용 식이 보충제나 천연물에 기반한 건강보조식품 내부에 포함된 부작용 심한 첨가물들을 분석하는데 쓰일 수 있음을 보였다. 또한 6개의 화합물을 동시에 매우 간단하게 분석할 수 있는 방법이며 많은 양의 샘플을 분석하여 검출하는데 시간을 줄일 수 있을 것으로 기대한다.

Part 2에서는 PDE-5 inhibitor 중의 하나인 sildenafil과 그 5가지 유사물질을 보조제 속에서 SPE와 DLLME-SFO를 통해 분석하였다. 6개 물질은 ion-pairing chromatography를 통해 HPLC-UV로 검출되었다. 사용된 mixed-mode SPE는 간단한 MeOH 세척만으로 영양제 안의 방해물질을 대부분 제거할 수 있었으며, DLLME-SFO를 통하여 대상 물질의 강력한 농축 효과가 나타나는

것을 알 수 있었다. 이러한 방법은 기존 LC-UV 방법보다 간단하고 빠르며 감도가 대단히 좋은 것으로 나타났으며, 이러한 방법을 통해 다양한 방해물질을 가진 보조제 내의 sildenafil 및 그 유사물질에 대한 분석에 매우 유용할 것으로 생각한다.

V. 참고문헌

1. Corbin JD, 2004. Mechanisms of action of PDE5 inhibition in erectile dysfunction. *International Journal of Impotence Research*. 16:S4-S7
2. Moreira SG, Brannigan RE, Spitz A, Orejuela FJ, Lipshultz LI, Kim ED 2000. Side-effect profile of Sildenafil citrate (Viagra) in clinical practice. *Urology* 56:474 -4766
3. Gratz SR, Flurer CL, Wolnik KA. 2004. 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
4. Porst H, Padma-Nathan H, Giuliano F, Anglin G, Varanese L, Rosen R, 2003, Efficacy of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction at 24 and 36 hours after dosing: a randomized controlled trial, *Urology* 62:121-125
5. Hedelin H, Stroberg P, 2005 Treatment for erectile dysfunction based on patientreported outcomes: to every man the PDE5 inhibitor that he finds superior, *Drugs* 65: 2245-2251
6. Palit V, Eardly I, 2010, An update on new oral PDE5 inhibitors for the treatment of erectile dysfunction, *Nat. Rev. Urol*. 7:603-609
7. Gundlach C, Martin KF, Heal DJ, Auerbach SB. 1997. In

Vivo Criteria To Differentiate Monoamine Reuptake Inhibitors from Releasing Agents: Sibutramine is a Reuptake Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther.* 283:581–591.

8. Hansen DL, Toubro S, Stock MJ, Macdonald IA, Astrup A. 1998. Thermogenic effects of sibutramine in humans. *Am J Clin Nutr.* 68:1180–1186.

9. James WPT, Astrup A, Finer N, Hilsted J, Kopelman P, Rössner S, Saris WHM, Van Gaal LF 2000, *Lancet*, 356:2115–2119

10. Meridia (sibutramine): Market Withdrawal Due to Risk of Serious Cardiovascular Events

<http://www.fda.gov/Safety/MedWatch/SafetyInformation/SafetyAlertsforHumanMedicalProducts/ucm228830.html>

11. Questions and answers on the suspension of medicines containing sibutramine EMA/808179/2009

12. 비만치료제 판매중지, 자발적 회수 권고. 2010, 식품의약품 안전청 보도자료 10.14

13. 건강기능식품 기준 및 규격 전면 개정 고시 2008-12

14. Blok-Tip L, Zomer B, Bakker F, Hartog KD, Hamzink M, Hove JT, Vredenburg M, de Kaste D. 2004. Structure elucidation of sildenafil analogues in herbal products. *Food Addit Contam.* 21:737–748.

15. Fleshner N, Harby M, Adomat H, Wood C, Eberding A, Hersey K, Guns E. 2005. Evidence for contamination of herbal erectile dysfunction products with phosphodiesterase

- type 5 inhibitors. *J Urol*. 174:636–641.
16. Mikami E, Ohno T, Matsumoto H, 2002. Simultaneous identification/determination system for phentolamine and sildenafil as adulterants in soft drinks advertising roborant nutrition. *Forensic Sci Int*. 130:140–146.
17. Moriyasu T, Shigeoka S, Kishimoto K, Ishikawa F, Nakajima J, Kamimura H, Yasuda I. 2001. Identification system for Sildenafil in health foods. *Yakugaku Zasshi*. 121:765–769.
18. Shin MH, Hong MK, Kim WS, Lee YJ, Jeoung YC. 2003. Identification of a new analogue of sildenafil added illegally to a functional food marketed for penile erectile dysfunction. *Food Addit Contam*. 20:793–796.
19. Zhu X, Xiao S, Chen B, Zhang F, Yao S, Wan Z, Yang D, Han H. 2005. 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.
20. Zou P, Oh SS, Hou P, Low M, Koh H. 2006. 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

21. Schnetzler G, Banks I, Kirby M, Zou KH, Symonds T, 2010, Characteristics, behaviors, and attitudes of men bypassing the healthcare system when obtaining phosphodiesterase type 5 inhibitors, *J. Sex. Med.* 7: 1237–1246.

22. Sugita M, Miyakawa M, 2010, Economic analysis of use of counterfeit drugs: health impairment risk of counterfeit phosphodiesterase type 5 inhibitor taken as an example, *Environ. Health Preventive Med.* 15:244–251.

23. Venhuis BJ, de Kaste D, Towards a decade of detecting new analogues of sildenafil, tadalafil and vardenafil in food supplements: A history, analytical aspects and health risks 2012, *J Pharm. Biomed. Anal.* 69:196–208

24. Japanese Food and Drug Administration Ministry, Concerning the discovery of a so-called health food (unlicensed and non-permitted) containing a sildenafil-like substance (hydroxy-homosildenafil), 2004

<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/02/h0213-3.html>

25. C. Shin, M. Hong, D. Kim, Y. Lim, 2004, Structure determination of a sildenafil analogue contained in commercial herb drinks, *Magn. Reson. Chem.* 42:1060–1062.

26. Zou P, Hou P, Low MY, Koh HL, 2006, Structural elucidation of a tadalafil analogue found as an adulterant of a herbal product, *Food Addit. Contam.* 23:446–451. ,

27. Zou P, Hou P, Oh SS, Low MY, Koh HL, 2006, Electrospray tandem mass spectrometric investigations of tadalafil and its analogue, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 20:3488–3490
28. Gratz SR, Gamble BM, Flurer RA. 2006. Accurate mass measurement using Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry for structure elucidation of designer drug analogs of tadalafil, vardenafil and sildenafil in herbal and pharmaceutical matrices. *Rapid Commun. Mass Spetrum.* 20:2317–2327.
- 29 .Hou P, Zou P, Low MY, Chan E, Koh HL, 2006, Structural identification of a new acetildenafil analogue from pre-mixed bulk powder intended as a dietary supplement, *Food Addit. Contam.* 23:870–875.
30. Reepmeyer JC, Woodruff JT, 2006, 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* 1125:6775
31. Lai KC, Liu YC, Tseng MC, Lin JH, 2006, Isolation and identification of sildenafil analogue illegally added in dietary supplements, *J. Food Drug Anal.* 14:1923
32. Reepmeyer JC, Woodruff JT, 2007, 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

33. Pissarnitski D, 2006, Phosphodiesterase 5 (PDE 5) inhibitors for the treatment of male erectile disorder: attaining selectivity versus PDE6, *Med. Res. Rev.* 26:369–395.

34. Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH, 2004, Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5), *Neurochem. Int.* 45 : 859–863.

35. Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Kirilovsky J, Hyafil F, Labaudiniere R, 2003, The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor.

1:5,6,11,11a-tetrahydro-1H-imidazo[1,5:1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,3(2H)-dione analogues, *J. Med. Chem.* 46: 4525–4532.

36., Bell AS, D. Brown D, N.K. Terrett NK, Pyrazolopyrimidone antianginal agents, Pfizer Research and Development Company, EP0463756 A1, 1991.

37. Bell AS, Terrett NK, Pyrazolopyrimidone antianginal agents, Pfizer Research and Development Company, EP0526004 A1, 1992.

38. Ellis P, Terrett NK, Pyrazolopyrimidones for the treatment of impotence, Pfizer Research and Development

company, WO94/28902, 1994

39. Kim H, Kim JH, Choi KI, Kim Y, Nam G, Seo JH, 2002, Novel Pyrazolopyrimidinethione derivatives. Preparation methods thereof and their use as therapeutics for erectile dysfunction, Korea Institute of Science and Technology, WO 02/102802 A1

40. Cho EY, Chung S, Kim JH, Kim D, Jin C, 2003, Effects of a new selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, KJH-1002, on the relaxation of rabbit corpus cavernosum tissue, J. Appl. Pharmacol. 11:232-237.

41. Liu B, 1,6-Dihydro-7H-pyrazolo[3,4-D]pyrimidin-7-one compound for the treatment of impotence, US10/736,732, 2005.

42. He ZJ, Zhang K, Jin J, Li NC, Na YQ, Bai WJ, Wang XF, Zhu JC, Jiang H, Yuan RP, Hong BF, Song T, Yang Y, Dai DX, 2006, Aildenafil citrate: a new potent and highly selective phosphodiesterase type 5 inhibitor for the treatment of erectile dysfunction, Zhonghua Nan Ke Xue 12: 1080-1083.

43. Wang J, Jiang Y, Wang Y, Zhao X, Cui Y, Gu J, 2007, Liquid chromatography tandem mass spectrometry assay to determine the pharmacokinetics of aildenafil in human plasma, J. Pharm. Biomed. Anal. 44: 231-235

44. Reepmeyer JC, Woodruff JT, d'Avignon DA, 2007,

Structure elucidation of a novel analogue of sildenafil detected as an adulterant in an herbal dietary supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43:1615–1621.

45. Gryniewicz CM, Reepmeyer JC, Kauffman JF, Buhse LF, 2009, Detection of undeclared erectile dysfunction drugs and analogues in dietary supplements by ion mobility spectrometry, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 601–606.

46. Reepmeyer JC, d'Avignon DA, 2009, Structure elucidation of thioketone analogues of sildenafil detected as adulterants in herbal aphrodisiacs, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49: 145–150

47. Ge X, Li L, Koh HL, Low MY, 2011, Identification of a new sildenafil analogue in a health supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56 :491–496.

48. Wollein U, Eisenreich W, Schramek N, 2011, Identification of novel sildenafil analogues in an adulterated herbal food supplement, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 56: 705–712.

49. Venhuis BJ, Zomer G, Hamzink M, Meiring HD, Aubin Y, de Kaste D, 2011, The identification of a nitrosated prodrug of the PDE-5 inhibitor aildenafil in a dietary supplement: a Viagra with a pop, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 54 :735–741.

50. Beghyn T, Hounsou C, Deprez BP, 2007, PDE5 inhibitors: an original access to novel potent arylated analogues of tadalafil, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17:789–792

51. van Deursen MM, Lock ER, Poortman–van der Meere AJ,

- 2006, Organic impurity profiling of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) tablets seized in The Netherlands, *Sci. Justice* 46:135–152.
52. Bohn M, Bohn G, Blaschke G, 1993, Synthesis markers in illegally manufactured 3,4-methylenedioxyamphetamine and 3,4-methylenedioxymethamphetamine, *Int. J. Legal Med.* 106: 1923.
53. Kurita H, Mizuno K, Kuromi K, Suzuki N, Ueno C, Kamimura M, Fujiwara A, Owada K, Ogo N, Yamamoto M, 2008, Identification of aminotadalafil and its stereoisomers contained in health foods using chiral liquid chromatography mass spectrometry, *J. Health Sci.* 54:310–314
54. Toomey VM, Litzau JJ, Flurer CL, 2011, Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements, *J. Pharm. Biomed. Anal.*
55. Hasegawa T, Takahashi K, Saijo M, Ishii T, Nagata T, Kurihara M, Haishima Y, Goda Y, Kawahara N, 2009, Isolation and structural elucidation of cyclopentynafil and N-octylnortadalafil found in a dietary supplement, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 57 :185–189.
56. Korean National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Instrumental Analysis Data of Illegal Compounds in Food, <http://www.nifds.go.kr>, 2010.
57. Novakova L, Maryoba L, Solich P. 2006. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. *Talanta*.

68:908–918

58. Lv H, Sun H, Wang X, Sun W, Jiao G, Zhou D, Zhao L, Cao H, Zhang G. 2008 Simultaneous determination by UPLC–ESI–MS of scoparone, capillarisin, rhein, and emodin in rat urine after oral administration of Yin Chen Hao Tang preparation. *J Sep Sci.* 31:659–666.

59. Morris HR, Paxton T, Panico M, McDowell R and Dell A. 1997. A novel geometry mass spectrometer, the Q–TOF, for low–femtomole/attomole–range biopolymer sequencing. *J Protein Chem.* 16:469–479.

60. Van Nieuwerburgh FCW, Vande Castele SRF, Maes L, Goossens A, Inzé, Van Bocxlaer J, Deforce DLD. 2006. Quantitation of Artemisinin and its biosynthetic precursors in *Artemisia annua* L. by high performance liquid chromatography–electrospray quadrupole time–of–flight tandem mass spectrometry *J Chromatogr A.* 1118:180–187

61. Lacorte S, Fernandez–Alba AR. 2006. Time of flight mass spectrometry applied to the liquid chromatographic analysis of pesticides in water and food. *Mass Spectrum Review.* 25:866–880

62. Kivilompolo M, Hyotylainen T. 2007. Comprehensive two–dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *J Chromatogr A.* 1145:155–164

63. Hernández F, Pozo O, Sancho JV, López FJ, Marin

JM, Ibañez M. 2005. Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS² using triple quadrupole and hybrid quadrupole time of flight analyzers. *Trends Anal Chem.* 24:596-612.

64. Kim JY, Park JY, Kim OY, Ham BM, Kim H, Kwon D, Jang Y and Lee JH. 2010. Metabolic Profiling of Plasma in Overweight/Obese and Lean Men using Ultra Performance Liquid Chromatography and Q-TOF Mass Spectrometry (UPLC-Q-TOF MS). *J Proteome Res.* 9:4368-437

65. Liu X, Li S, Zhou Y, Song JZ, Zheng YF, Peng GP, Xu HX. 2010. Characterization of protostane triterpenoids in *Alisma orientalis* by ultra-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 24:1514-1522

66. Nanni P, Levender F, Roda G, Caponi A, James P, Roda A. 2009. A label-free nano-liquid chromatography-mass spectrometry approach for quantitative serum peptidomics in Crohn's disease patients. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 877:3127-3136.

67. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S, 2006, Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction, *J Chromatogr A*, 1116:1-9

68. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M, 2010, Evolution of

dispersive liquid-liquid microextraction method, J Chromatogr A, 1217 : 2342-235

69. Zanjani MRK, Yamini Y, Shariati S, Jonsson JA, 2007, A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop, Anal. Chim. Acta. 585:286-293

70. 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. 2007. Structure determination of new analogues of vardenafil and sildenafil in dietary supplements. Food Addit Contam. 24:122-129.

71. 식품공전, 식품 중 발기부전 치료제 및 유사물질 검출법

72. Guideline on bioanalytical method validation, EMEA/CHMP/EWP/192217/2009

73. Jia S, Kang YP, Park JH, Lee J, Kwon SW, 2011, Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry, J Chromatogr A, 1218 : 9174-9182

74. Jain DS, Subbaiak G, Sanyal M, Shrivastav P, Pal U, Ghathaliya S, Kakad A, Patel H, Shah S. 2006. Liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry validated method for the simultaneous quantification of sibutramine and its primary and secondary amine metabolites in human plasma and its application to a

bioequivalence study. Rapid Commun Mass Spetrum. 20:3509–3521.

75. Wang J, Chen B, Yao S. 2008. Analysis of six synthetic adulterants in herbal weight-reducing dietary supplements by LC electrospray ionization-MS. Food Addit Contam. 25:822–830.

76. Bradbury R, Hancox N, Hatt H, 1947, The reaction between acetone and ammonia: the formation of pyrimidine compounds analogous to the aldoxans of sp α th ,J Chem Soc (Resumed), 1394–1399.

77. Hancox N, Aust J Chem, 1950, The Reaction between Acetone and Ammonia. II. Isomeric Oximinoketones related to Diacetoamine, 3:450–460.

78. Assessment report for sildenafil ratiopharm ,2009, Evaluation of Medicines for Human Use, EMA

79. <http://en.chembase.cn/molecule-178581.html>

80. Poplawska M, Blazewicz A, Bukowinska K, Fijalek Z, 2013, Application of high-performance liquid chromatography with charged aerosol detection for universal quantitation of undeclared phosphodiesterase-5 inhibitors in herbal dietary supplements, J Pharm Biomed Anal, 84:232–243

81. Zhu X, Xiao S, Chen B, Zhang F, Yao S, Wan Z, Yang D, Han H, 2005, 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

82. Savaliya AA, Shah RP, Prasad B, Singh S, 2010, Screening of Indian aphrodisiac ayurvedic/herbal healthcare products for adulteration with sildenafil, tadalafil and/or vardenafil using LC/PDA and extracted ion LC MS/TOF, *J Pharm Biomed Anal*, 52:406-409

83. Zou P, Oh SS, Hou P, Low M, Koh H, 2006, 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

84 Fattahi N, Samadi S, Assadi Y, Hosseini MRM, 2007, Solid-phase extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction-ultra preconcentration of chlorophenols in aqueous samples, *J Chromatogr A*, 1169:63-69.

85 Yao C, Li T, Twu P, Pitner WR, Anderson JL, 2011, Selective extraction of emerging contaminants from water samples by dispersive liquid-liquid microextraction using functionalized ionic liquids. *J Chromatogr A*, 1218:1556-1566

86. Wu Q, Wang C, Liu Z, Wu C, Zeng X, Wen J, Wang Z, 2009, Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for the determination

of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography J Chromatogra A, 1216:5504-5510.

87. Fontana AR, Lana NB, Martinez LD, Altamirano JC, 2010, Ultrasound-assisted leaching-dispersive solid-phase extraction followed by liquidliquid microextraction for the determination of polybrominated diphenyl ethers in sediment samples by gas chromatographytandem mass spectrometry, Talanta, 82:359-366.

88. Zhao E, Zhao W, Han L, Jiang S, Zhou Z, 2007, Application of dispersive liquid liquid microextraction for the analysis of organophosphorus pesticides in watermelon and cucumber, J Chromatogr A, 1175:137-140.

* PART 1의 내용은 Food additive and contaminant A에 발표한 본인의 논문 내용을 편집한 것임을 밝힙니다.

Abstract

ROH Si Hun

College of Pharmacy

Seoul National University

The drug adulteration of dietary supplements was very dangerous effect for human health.

In part 1 of this study, a simultaneous method was used to examine three synthetic PDE-5 inhibitors (sildenafil, vardenafil, and tadalafil), sibutramine and its two major analogues (N-desmethylsibutramine and N,N-didesmethylsibutramine) using ultra performance liquid chromatography (UPLC) coupled with quadrupole time of flight mass spectrometry (Q-TOF MS) in dietary supplements. This approach using UPLC/Q-TOF MS showed the high accurate mass of six compounds for identification and short run time. Accuracy of this method was from 87% to 113% and precision was less than 12.8%. The limit of detection and limit of quantification were between 0.44 ng/g

and 2.0 ng/g and between 1.34 ng/g and 6.07 ng/g, respectively. This method allows easy and fast analysis and detection of diverse adulterants.

In part 2, the solid samples were first extracted by methanol, and then cleaned up and pre-concentrated by solid phase extraction along with dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic droplets (DLLME-SFO). Factors influencing the extraction efficiency were optimized, including the type of SPE cartridge, the pH of extraction environment, the type of extraction and dispersive solvents, and the volume of extraction solvent. Under the optimized conditions, the method was linear over the range of 5–100 ng mL⁻¹ for sildenafil, homosildenafil, udenafil, benzyildenafil and thiosildenafil, and 10–100 ng mL⁻¹ for acetildenafil with R² higher than 0.996. Intra- and inter-day precisions expressed as relative standard deviations were less than

5.7% and 9.9%, respectively. The limits of detection were between 2.5–7.5 ng mL⁻¹. The developed method was successfully applied for the analysis of sildenafil and its five analogues in complex dietary supplements using a basic LC–UV system.

Keyword: Adulteration, PDE–5 inhibitor, Sibutramine, UPLC/Q–TOF, Dietary supplement, Dispersive liquid–liquid extraction

Student number : 2006–21967