

식품 중 발기부전치료제 유사물질 규명

서정혁* · 최장덕 · 박건상 · 허수정 · 윤태형 · 김은주 · 한승우 ·
김소희 · 이광호 · 권성원¹ · 김득준¹

식품의약품안전평가원 식품위해평가부, ¹서울대학교 약학대학
(2009. 4. 18. 접수, 2009. 5. 5. 승인)

Elucidation of new anti-impotency analogue in food

Junghyuck Suh*, Jangduck Choi, Kunsang Park, Soojung Hu, Taehyung Yoon, Eunju Kim,
Seungwoo Han, Sohee Kim, Kwangho Lee, Sungwon Kwan¹ and Deukjoon Kim¹

Food Safety Evaluation Department, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation

¹Institute of Pharmaceutical Sciences, Seoul National University

(Received April 18, 2009; Accepted May 5, 2009)

요 약: 식품 중 불법적으로 첨가된 부정유해물질을 규명하기 위하여 HPLC/PDA를 이용하여 인삼성분을 함유한 것으로 선전하는 식품 원료를 조사하였다. 발기부전치료제로 사용되는 실데나필의 변형체인 홍데나필과 유사한 구조를 갖는 미지물질이 확인되어 분취 크로마토그래피 등을 이용하여 불순물을 제거한 다음 HPLC/MS/MS, NMR 등의 기기를 이용하여 그 구조를 규명하였다. HPLC/MS 분석결과 미지물질이 480 m/z의 분자량을 갖는 물질임을 확인하였으며 LC/MS/MS 분석 결과 실데나필에서 특징적으로 검출되는 m/z인 311, 339, 353이 확인되어 발기부전치료제와의 구조적 유사성을 확인할 수 있었다. NMR 분석 결과 미지물질은 홍데나필과 같이 sulfonyl기가 acetyl기로 치환된 것을 확인할 수 있었으며 실데나필의 에틸피페라진기가 옥소에틸피페라진기로 치환된 구조를 갖는 물질임을 확인하여 그 이름을 옥소홍데나필로 명명하였다.

Abstract: The new anti-impotency analogue was identified in food source. Detection of this analogue was accomplished through screening of food samples by liquid chromatography/photodiode array detector. The spectrum pattern of analogue compound was similar to that observed for hongdenafil which was analogue of sildenafil. This new compound was isolated and purified using the liquid-liquid extraction, thin layer chromatography, column chromatography and preparative HPLC. And then those structure were identified using analytical instruments such as HPLC/PDA, LC/MS/MS and NMR. The compound was given a name to oxohongdenafil which was replaced with acetyl oxoethylpiperazinyl residue instead of sulfonyl piperazine group of sildenafil. The regulation for the above-mentioned analogue, oxohongdenafil, was established by Standard of Korean food code.

Key words: anti-impotency, elucidation, food, regulation, oxohongdenafil

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)2-380-1670-2 Fax : +82-(0)2-357-4735

E-mail : rndsuh@kfda.go.kr

1. 서 론

최근 소득 수준이 향상됨에 따라 행복하고 건강한 삶에 대한 욕구가 높아지면서 식품과 의약품의 건강 증진 및 유지의 수단으로 이용하고자 하는 사람들이 늘고 있는 실정이며 일부 사람들은 이러한 추세에 편승하여 식품에 사용할 수 없는 의약품 성분 및 그 유사물질을 식품에 혼입하여 보다 빠르고 강한 효과를 나타낼 수 있는 식품들을 생산·판매하고 있다. 이에 따라 정부 당국에서는 2001년도에 비아그라 성분이 함유된 수입주류를 적발한 이후 데메틸홍데나필, 데스메틸시부트라민, 아세틸바데나필 등 Table 1에서와 같이 식품 중 기준규격을 설정하여 고시함으로써 의약품 및 부정유해물질이 혼입된 불법 식품에 대한 단속을 강화하고 있으나 일부 식품 생산자들은 의약품 성분의 구조를 일부 변형시켜 혼입하는 방법으로 정부의 검사 시스템을 피하기 위한 편법을 시도하고 있다.¹⁻¹² 특히 최근의 발기부전치료제 유사물질들은 과거의 발기부전치료제 유사물질처럼 일부 구조나 위치만 변경하는 수준을 뛰어넘어 활성부위는 유지하되 기타 구조를 다양하게 변형시킴으로써 신규 부정 유해물질의 규명을 더욱 어렵게 만들고 있다. 이렇게 변형된 구조를 갖는 유사물질들은 임상학적 안전성에 대한 실험 및 조사가 이루어지지

않은 상태에서 유통됨으로 그 유해성은 매우 심각하다고 할 수 있다. 이에 따라 외국에서는 식품 중의 부정유해물질 규명을 위해 지속적으로 관심을 기울이고 있다. 미국의 경우 식품의약품청(Food and Drug Administration, FDA)에서는 FT/ICR 질량분석기(Fourier Transform-Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry, FT/ICR/MS)를 사용하여 실데나필, 바데나필과 근원적으로 유사한 구조를 갖는 부정유해물질들을 조사하여 피페리디노홍데나필을 검출하여 보고한 바 있으며 2008년도에는 식품에서 치오메티오실데나필을 검출하여 회수명령과 함께 소비자들에게 주의를 촉구한 바 있다.¹³ 일본의 경우 후생노동성에서 식품 중 의약품 성분 및 부정유해물질에 대한 지속적인 모니터링을 수행하여 잔소안트라필, 노르네오실데나필 및 카보데나필을 새롭게 규명하였으며 2008년도에는 식품에 함유된 부정유해물질에 대한 지속적인 관리로 싸이클로펜티나필, N-옥틸노르타다라필, 치오퀴나피페리필을 규명하여 검출 정보를 페이지에 게재하고 있다.¹⁴⁻¹⁵ 따라서 본 연구에서는 식품의 안전성 확보를 위해서 식품에 불법적으로 혼입된 부정유해물질을 검출하여 그 구조를 규명함으로써 편법적인 불법 식품의 유통을 근절하기 위한 기반 여건을 마련하고 관련 정보를 제공하고자 하였다.

Table 1. The status list of elucidation for illegal compounds in foreign country and Korea.

Compound name	Elucidation date	elucidation nation
Homosildenafil ²	2002.04.	Korea (KFDA)
Hongdenafil ³	2003.07.	Korea (KFDA)
Hydroxyhomosildenafil ⁴	2004.02.	Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Aminotadalafil ⁵	2005.04.	Korea (KFDA)
Pseudovardenafil ⁶	2005.06.	Korea (KFDA)
Hydroxyhongdenafil ⁶	2005.12.	Korea (KFDA)
Dimethylsildenafil ⁷	2006.06.	Korea (KFDA)
Xanthoanthrafil ⁸	2006.06.	Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Norneosildenafil ⁹	2006.07.	Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Hydroxyvardenafil ⁷	2006.08.	Korea (KFDA)
Demethylhongdenafil	2007.04.	Korea (KFDA)
Piperidinhongdenafil ¹⁰	2006.05.	USA (FDA)
Carbodenafil ¹¹	2007.04.	Japan (Ministry of Health, Labour and Welfare)
Thiosildenafil	2007.07.	Korea (KFDA)
Demethylthiosildenafil	2007.07.	Korea (KFDA)
Acetylvardenafil	2007.07.	Korea (KFDA)
Benzylsildenafil	2007.10.	Korea (KFDA)
Desmethylsibutramine ¹²	2007.10.	Korea (KFDA)

2. 실험

2.1. 시료 및 시약

본 연구에서는 식품 검사 기관과의 공조를 통하여 부정유해물질이 함유된 것으로 의심되는 시료에 대해 정보 및 시료 공유를 통하여 식품원료로 수입된 제품에 대해 조사하였다. 본 연구의 대상 시료는 녹색을 띠는 분말 형태의 식품 원료 물질을 사용하였다. 실험에 사용한 증류수는 Nanopure Diamond water purification system (Barnstead International Co., Dubuque, IOWA, USA)에 의해 정제된 3차 증류수를 사용하였다. 시약으로는 아세트니트릴(Merck Co., USA, HPLC용), 헥산(Merck Co., USA, HPLC용), 메탄올(Merck Co., USA, HPLC용), 디클로로메탄(Merck Co. USA, HPLC용), 탄산수소나트륨(Wako Co., Japan, 특급시약), 황산나트륨(Wako Co., Japan, 특급시약), DMSO-d6(Sigma Co., USA, 특급시약), sodium hexanesulfonate(Sigma Co., USA, 특급시약), ammonium formate(Sigma Co., USA, 특급시약), 개미산(Fluka, USA)을 사용하였다.

2.2. 실험방법

발기부전치료제 유사물질을 확인하기 위해 식품공전에 따라서 250 mL 원심분리관에 시료 10 g을 취한 다음 증류수 30 mL 및 메탄올 70 mL를 넣어 30 분간 진탕 추출하였다.¹⁶ 추출액을 원심분리 후 0.45 µm 실린지필터로 여과하여 여액을 HPLC/PDA에 주입하여 발기부전치료제 유사물질을 확인하였다. 확인된 유사물질을 규명하기 위하여 시료 500 g을 250 mL 원심분리관에 각각 20 g씩 취한 다음 메탄올 100 mL로 2회 진탕 추출하였다. 추출액을 1 L 분액여두에 넣은 다음 증류수 170 mL와 디클로로메탄 300 mL를 넣어 잘 흔들어 정치하였다. 하층의 디클로로메탄 층을 취한 다음 분액여두에 디클로로메탄 200 mL를 넣어 액-액 추출하여 디클로로메탄 층을 합쳐 40 °C에서 감압하에 농축하였다. 농축액을 다시 메탄올 50 mL에 녹인 다음 분취용 HPLC에 주입하여 유사물질로 확인된 물질을 동정하였다.

2.3. 기기

발기부전치료제 유사물질을 확인하기 위하여 HPLC system (Nanospace SI-2, Shiseido Co. Japan)을 사용하였으며 검출기는 Photodiode array detector (=200~400 nm), 컬럼은 capcellpak UG120 C₁₈, 이동상은 sodium hexanesulfonate를 첨가한 증류수와 아

Table 2. Instrumental condition for HPLC analysis

Column	Shiseido capcellpak C ₁₈ (4.6 mm ID×250 mm, 5 µm)		
Mobile Phase	A : 0.1% phosphoric acid and sodium-1-hexane sulfonate in water B : Acetonitrile		
Gradient condition	Time(min)	B%	
	Init.	5	
	1.0	5	
	6.0	20	
	21.0	55	
	29.0	100	
	35.0	100	
Flow rate	36.0	5	
	40.0	5	
	Flow rate	1.0 mL/min	
	Column temperature	40 °C	
	Injection volume	10 µL	
Detector	UV 291 nm (210~400)		

Table 3. Instrumental condition for preparative HPLC analysis

Column	Shiseido capcellpak C ₁₈ (20 mm ID×250 mm, 5 µm)	
Mobile Phase	A : 0.1% formic acid in water B : Acetonitrile	
Isocratic condition	Time(min)	B%
	Init.	30
Isocratic condition	30.0	30
	Flow rate	20 mL/min
Column temperature	25 °C	
Injection volume	900 µL	
Detector	UV 291 nm (210~400)	

세트니트릴을 사용하였으며 분석조건은 Table 2와 같았다. 시료 정제를 위하여 분취 크로마토그래피(HP 1100, Agilent Co, USA)를 사용하였다. 분취용 컬럼은 capcellpak UG120 C₁₈을 사용하였으며 분석조건은 Table 3과 같았다. 미지물질의 분자량 확인을 위하여 LC/MS/MS (Finnigan EMR, Thermo, USA)를 사용하였으며 구조 확인을 위해 NMR (Avance 400, Bruker, German)을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC/PDA를 이용한 미지물질 확인

부정유해물질이 혼입되었을 것으로 판단되는 인삼

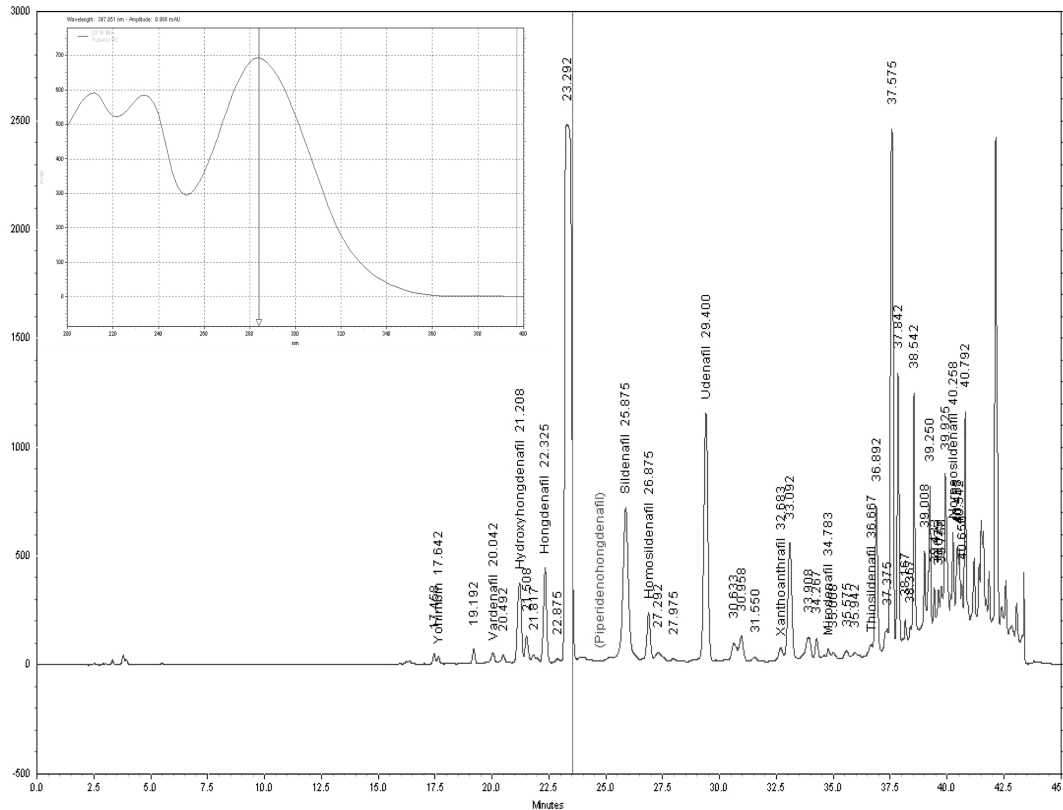


Fig. 1. HPLC-PDA chromatogram and PDA spectrum of sample containing unknown compound.

성분을 함유한 식품 원료를 식품공전에 따라 추출하여 HPLC/PDA를 분석한 결과는 Fig. 1과 같았다. Fig. 1에서와 같이 미지 물질은 23.2분에서 검출되었으며 220 nm에서 최대흡수파장을 나타내는 스펙트럼은 Fig. 2와 같이 실데나필의 스펙트럼과는 상이하였으나 실데나필 유사물질인 홍데나필과 매우 유사한 스펙트럼을 갖는 것으로 확인하였다.¹⁷ 따라서 미지물질의 구조는 홍데나필이 실데나필과 차이가 나는 sulfonyl기가 acetyl기로 치환되었을 것으로 추정할 수 있었다.

3.2. HPLC/MS를 이용한 분자량 확인 및 패턴 분석

Fig. 3에서 미지시료의 HPLC/MS 크로마토그램을 나타내었다. 12.7분에서 검출된 미지 시료의 $[M+H]^+$ 이 481 (m/z)임을 확인하였으며 이 값을 실데나필의 $[M+H]^+$ 475 (m/z) 값과 비교했을 때 6 amu의 차이가 있었으며 홍데나필의 $[M+H]^+$ 467 (m/z) 값과 비교했

을 때 14 amu의 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 홍데나필과 유사한 미지물질의 구조 예측을 위하여 실데나필과 미지물질의 HPLC/MS/MS 스펙트럼을 비교 확인하였다. Fig. 4 및 Table 4에서 확인할 수 있듯이 실데나필 및 홍데나필의 구조적 특징을 나타낼 수 있는 분자이온 311, 339, 353 (m/z)이 미지물질에서도 확인되어 미지물질과 발기부전치료제와의 구조적 유사성을 확인할 수 있었다.¹⁸

3.3. NMR을 이용한 구조 규명

미지 물질의 구조를 규명하기 위하여 NMR (Nuclear Magnetic Resonance)을 이용하여 분석하였다. Fig. 5와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 의 피크를 동정하였다. Fig. 5에서 동정된 화학적이동 값을 실데나필 및 실데나필 유사물질인 홍데나필의 값과 비교한 자료를 Table 3에 나타내었다. Table 4에서 나타난 것과 같이 미지 물질의 화학적이동 값이 실데나필의 유사물질인 홍데나필의 값과 유사한 것을 확인할 수 있었다.

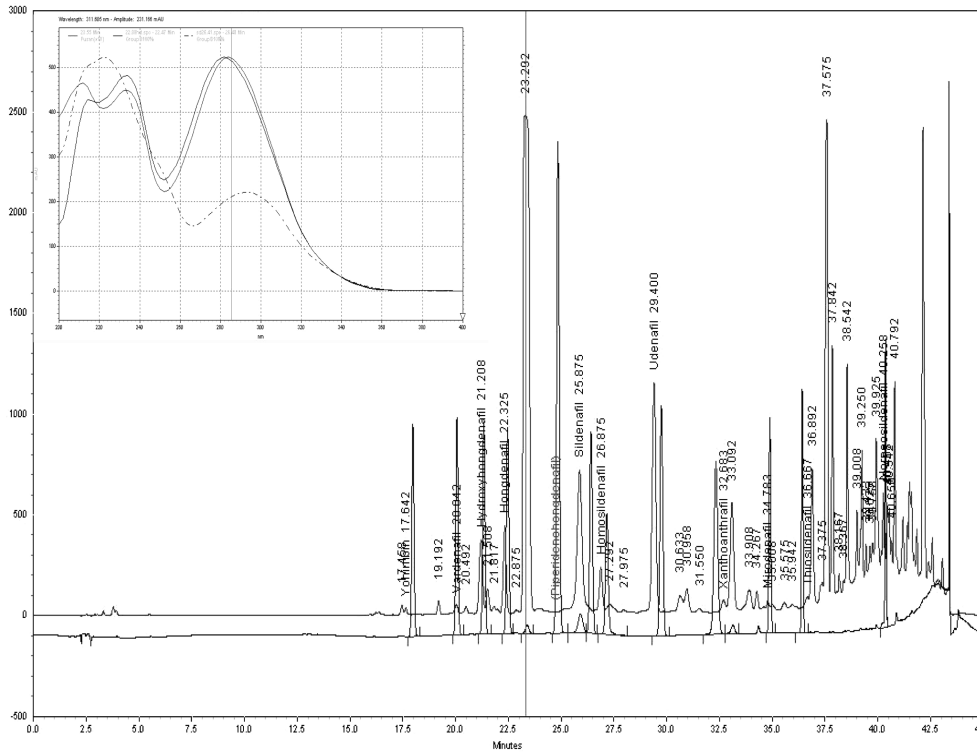


Fig. 2. HPLC/PDA chromatogram and spectra of standard and sample containing unknown compound.

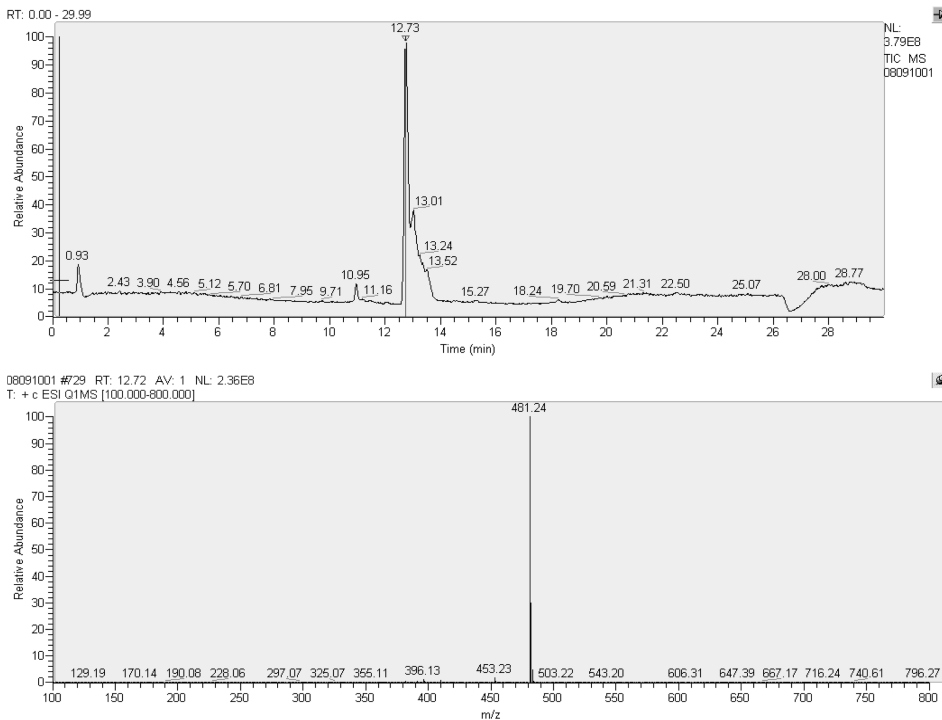


Fig. 3. MS chromatogram and mass spectrum of sample containing unknown compounds.

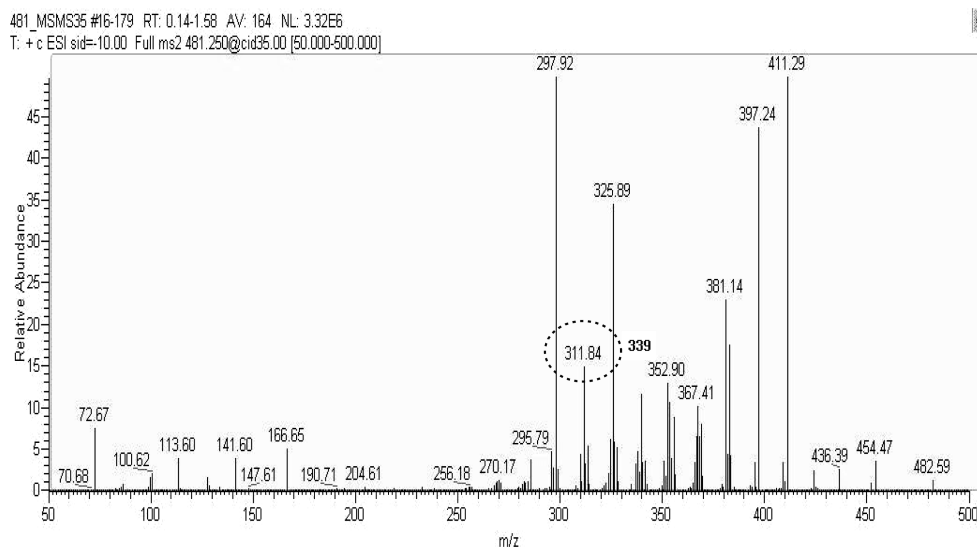


Fig. 4. MS/MS spectrum of unknown compound.

Table 4. Comparison on chemical shift of ^1H -NMR and ^{13}C -NMR for unknown compound, sildenafil and hongdenafil

No.	Unknown compound (DMSO- d_6)		Sildenafil (DMSO- d_6)		Hongdenafil (DMSO- d_6)	
	d (^{13}C)	d (^1H)	d (^{13}C)	d (^1H)	d (^{13}C)	d (^1H)
1	145.0	-	145.0	-	144.9	-
4	153.9	-	153.8	-	153.8	-
5	-	12.18(1H,NH)	-	12.23(1H,br, s)	-	12.14(1H, br, s)
6	149.0	-	148.2	-	148.9	-
8	138.0	-	137.8	-	137.9	-
9	124.4	-	124.4	-	124.3	-
10	38.0	4.14(3H,s)	37.9	4.16(3H, s)	37.8	4.16(3H,s)
11	27.2	2.76(4H,m)	27.2	2.77(2H,t, $J=7.5$)	27.2	2.79(2H,t, $J=7.5$)
12	21.9	1.71(2H,m)	21.7	1.73(2H,m)	21.8	1.74(2H,m)
13	13.9	0.91(3H, t, $J=7.3$)	13.9	0.93(3H,t, $J=7.3$)	13.8	0.94(3H,t, $J=7.4$)
14	128.0	-	126.1	-	128.2	-
15	130.8	8.13(H,d, $J=4.6, 1.0$)	130.0	7.86(1H,d, $J=2.3$)	131.2	8.27(H,d, $J=2.2$)
16	123.1	-	123.8	-	122.8	-
17	132.4	8.10(1H,dd, $J=4.3, 1.0$)	131.6	7.84(1H,dd, $J=8.8, 2.4$)	132.5	8.16(H,dd, $J=8.8, 2.2$)
18	112.5	7.21(H,d, $J=8.6$)	113.3	7.38(1H,d, $J=8.8$)	112.3	7.24(H,d, $J=8.8$)
19	160.3	-	160.0	-	160.1	-
20	64.7	4.18(2H,m, $J=6.8$)	64.9	4.21(2H,q, $J=6.9$)	64.6	4.20(2H,q, $J=7.0$)
21	14.4	1.31(3H,t, $J=6.9$)	14.3	1.33(3H, t, $J=6.9$)	14.3	1.34(3H,t, $J=6.9$)
22	194.8	-	-	-	195.3	-
23	62.0	3.94(2H, s)	-	-	64.3	3.74(2H, s)
24,28	49.3	3.27(4H, br,m)	45.1	2.97(4H, br, m)	52.8	2.50(4H,br, m)
25,29	45.3	2.76(4H,br,m)	53.1	2.59(4H, br, m)	51.6	2.38(4H,br, m)
25,27						
26,28						
28	165.4	-	-	-	-	-
29	56.7	3.13(2H, s)	44.5	2.29(3H, s)	-	-
30	40.3	3.27(4H,br,m)	-	-	52.3	2.29(2H,q, $J=7.1$)
31	12.1	1.01(3H,t, $J=7.3$)	-	-	12.0	0.98(3H,t, $J=7.2$)

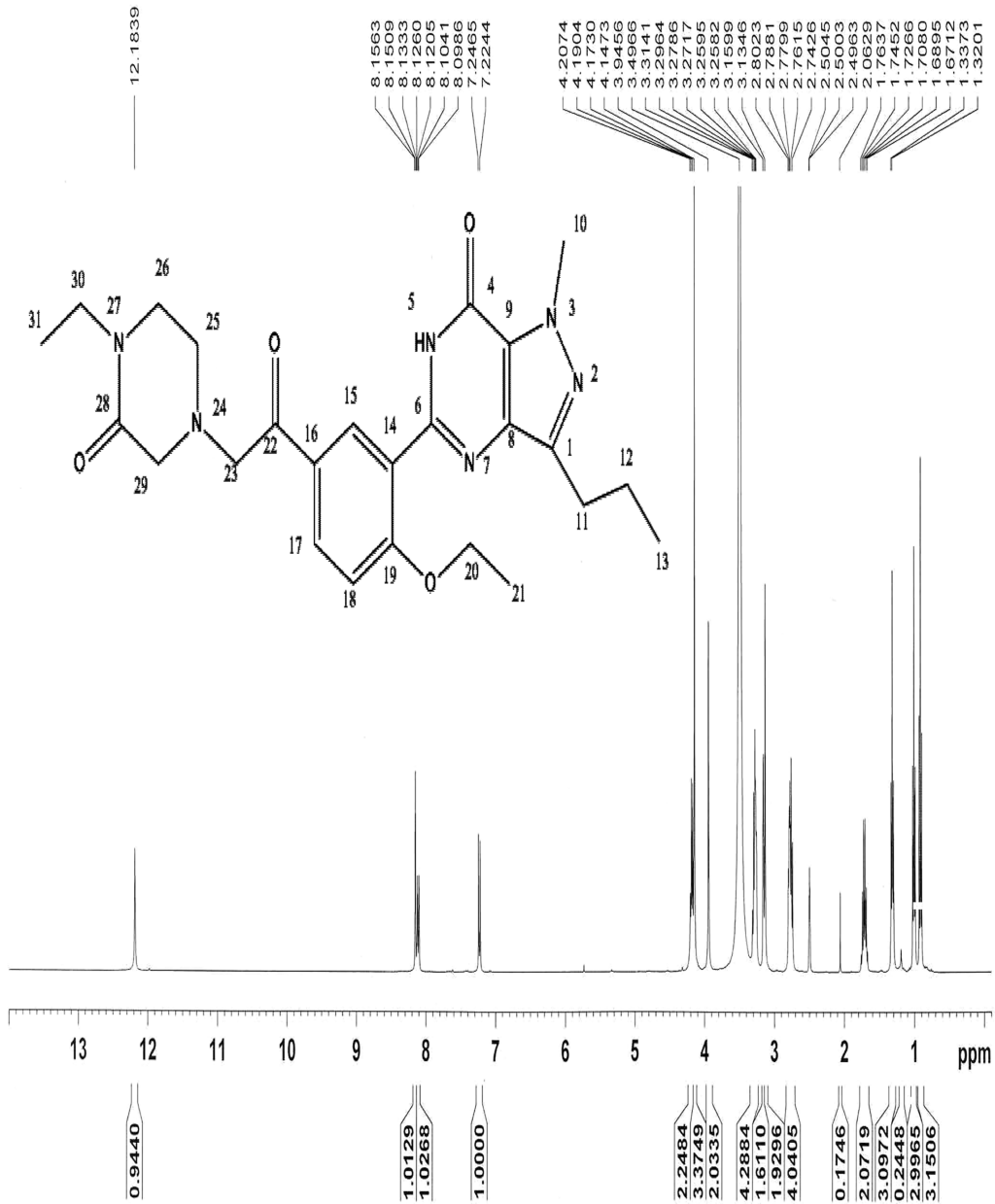


Fig. 5. ¹H-NMR spectrum of unknown compound.

다만 ¹H-NMR 자료에서 흥테나필과 차이가 있는 부분은 3.13 ppm (2H, s)에서 검출된 피크였으며 ¹³C-NMR 자료에서는 56.7 ppm 및 165.4 ppm에서 검출된 피크로서 piperazine 링에 해당하는 부분만 차이가 있는 것으로 확인되어 piperazine 링이 변형된 것으로 추정할 수 있었다. Table 5에서는 미지 물질의 구조 규명을 위

하여 분석한 COSY (COrrrelation SpectroscopY), ¹H-¹³C HMQC, ¹H-¹³C HMBC 및 DEPT의 자료를 나타내었다.

3.4. 미지물질의 구조 결정

위의 HPLC/PDA, HPLC/MS, LC/MS/MS 및 NMR

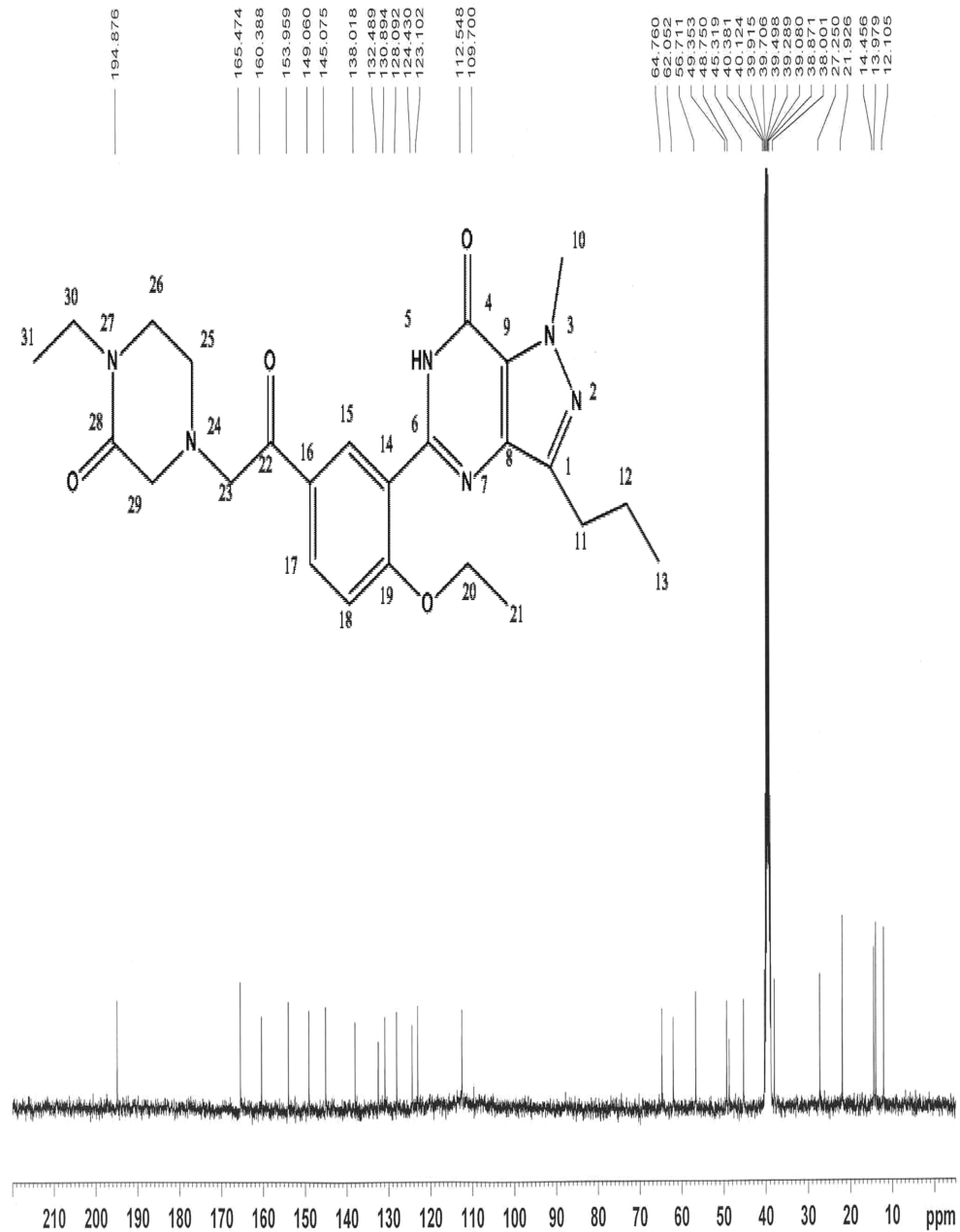


Fig. 6. ^{13}C -NMR spectrum of unknown compound.

자료를 종합적으로 검토할 때 미지 물질은 Fig. 6과 같이 실데나필의 sulfonyl기가 흥테나필처럼 acetyl기로 치환되고 ethylpiperazine기가 oxoethylpiperazinyl기로 치환된 구조를 갖는 분자량 480($\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_4$)의

화합물로 화학명이 5-[2-Ethoxy-5-{2-(4-ethyl-3-oxo-piperazin-1-yl)acetyl}phenyl]-1-methyl-3-propyl-1,6-dihydropyrazolo[4,3-*d*]pyrimidin-7-one인 물질로 확인하였으며 일반명을 옥소흥테나필로 명명하였다.

Table 5. Distortionless enhancement by polarisation transfer (DEPT), correlation spectroscopy (COSY) and heteronuclear multiple bond correlation (HMBC) data for unknown compound

Number	DEPT	COSY	HMBC
1	C	-	H-11, H-12
4	C	-	
6	C	-	H-15
8	C	-	H-11
9	C	-	H-5
10	CH ₃	-	
11	CH ₂	H-12	H-12, H-13
12	CH ₂	H-11/H13	H-11, H-13
13	CH ₃	H-12	H-11, H-12
14	C	-	H-15, H-18
15	CH	H-17	H-17, H-18
16	C	-	H-18
17	CH	H-15/H-18	H-15, H-18
18	CH	H-17	H-17
19	C	-	H-15, H-17, H-20, H-18
20	CH ₂	H-21	H-21
21	CH ₃	H-20	H-20
22	C		H-15, H-17, H-23
23	CH ₂		H-21
25, 29	CH ₂	H-26	H-23
26	CH ₂	H-25	H-30
28	C		H-26, H-29
30	CH ₂	H-31	H-31
31	CH ₃	H-30	H-30

참고문헌

1. 식품의약품안전청 연구보고서, **6**, 459(2002).
2. M. Shin, M. Hong, W. Kim, J. Lee and Y. Jeong, *Food Addit. Contam.*, **20**, 793-796(2003).
3. C Shin, M. Hong, D. Kim and Y. Lim, *Magn. Res. Chem.*, **42**, 1060-1062(2004).

4. Japan Homepage (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2004/02/h0213-3.html>).
5. H. Kurita, K. Mizuno, K. Kuromi, N. Suzuki, C. Ueno, M. Kamimura, A. Fujiwara, K. Owada, N. Ogo and M. Yamamoto, *J. Health Sci.*, **54**, 310-314(2008).
6. D. Choi, S. Park, T. Yoon, H. Jeong, J. Pyo, J. Park, D. Kim and S. Kwon, *J. AOAC Int.*, **91**, 580-588(2008).
7. H Park, H. Jeong, M. Chang, M. Im, J. Jeong, D. Choi, K. Park, M. Hong, S. Han, D. Kim, J. Park and S. Kim, *Food Addit. Contam.*, **24**, 122-129(2007).
8. Japan Homepage (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2006/05/h0522-3.html>)
9. A. Hosogai, K. Hamada, M. Tomita, A. Magashima, T. Takahashi, T. Sekizawa, T. Mizutani, Y. Urano, A. Kuroda, D. Sawada, T. Ozaki, J. Seki and T. Goto, *N European Journal of Pharmacology*, **428**, 295-302(2001).
10. S. Gratz, B. Gamble and R. Flurer, *Rapid commun. Mass. Spectrom.*, **20**, 2317-2327(2006).
11. Japan Homepage (<http://www.mhlw.go.jp/houdou/2007/04/h0420-4.html>)
12. 식품의약품안전청 연구보고서, **11**, 426(2007).
13. US, Homepage (http://www.fda.gov/oc/po/firmrecalls/jackdistribution07_08.html)
14. Japan Homepage (<http://www-bm.mhlw.go.jp/houdou/2008/06/h0611-1.html>)
15. Japan Homepage (<http://www-bm.mhlw.go.jp/houdou/2008/06/h0626-2.html>)
16. 식품의약품안전청, '식품공전', 2008.
17. 식품의약품안전평가원, '식품 중 부정물질 분석', (행정간행물등록번호; 11-1470550-000001-14), 2009.
18. S. Singh, B. Prasad, A. A. Savaliya, R. P. Shah, V. M. Gohil and A. Kaur, *Trends Anal. Chem.*, **28**, 13-28(2009).