

LC-ESI-tandem MS를 이용한 기능성표방식품 중 부정유해물질 신속검사체계 개발

김희연 · 이화미* · 장영미 · 주현진 · 정용현 · 이명숙 · 박종석 · 이광호

경인지방식품의약품안전청 유해물질분석팀

Development of Rapid Analytical Method of Forbidden Medicines in Dietary Supplements Using LC-ESI-Tandem MS

Hee-Yun Kim, Hwa-Mi Lee*, Young-Mi Jang, HyunJin Joo, Young-Hyun Jung,
Myoung-Sook Lee, Jong-Seok Park, and Kwang-Ho Lee

Hazard Substances Analysis Team, Center for Food and Drug Inspection,
Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration

Abstract A high-performance liquid chromatography-electrospray ionization (HPLC-ESI) tandem MS was developed for the rapid and simultaneous determination of forbidden medicines in dietary supplements. Thirteen medicinal components such as PDE-5 inhibitors and their analogues, and the newly identified dimethylsildenafil and xanthoanthrafil, were included in this study. After tentative standardization of molecular ions in both polarities using thirteen references on the mass spectrometer, with ESI-continuous infusion via the syringe pump method, the relative intensity of the ions present in the resulting spectra was quantitatively compared. From the results, the ion mode was selected depending on each reference's characteristics. A HPLC method coupled with the ESI mode was developed considering the matrix effect and interference depending on the type of sample. The validation test of the developed method was followed by carrying out precision, accuracy, recovery, sensitivity and linearity, etc. The method showed sufficiently high sensitivity, reproducibility, and specificity, and produced 4 times faster results when compared with the existing HPLC/UV method for the determination of forbidden compounds in dietary supplements.

Key words: forbidden medicines, dietary supplements, HPLC/UV, PDE-5 inhibitors, LC-ESI-tandem MS

서 론

국민의 소득수준 향상과 함께 삶의 질에 대한 관심이 높아짐에 따라 건강에 밀접한 식품의 안전은 사회적으로 민감한 이슈가 되고 있으며(1) 많은 사람들이 일상의 식이에서 부족한 성분을 보충할 목적으로 기능성 식품이나 영양보충용식품 등으로 식생활 및 체질개선 등 식품에서의 기능성에 관한 관심이 높아지고 있고 소비량 또한 증가하고 있다(2-5). 이러한 기능성표방식품의 제조에 사용할 수 있는 원료 또는 성분은 기능성표방식품의 원료 또는 성분으로 사용할 수 있다고 인정한 것과 식품공전에 따라 식품의 원료로 사용할 수 있는 것으로서(6) 국민의 건강에 대한 관심과 노력이 나날이 증대되어 가고 있는 현실에서 식품의 안전성이 더욱 중요해지고 있다. 식품의약품안전청에 따르면 지난 해 3/4분기까지 89개 제품에서 안전이 확보되지 않은 발기부전치료제와 유사물질이 검출되는 등 이들 제품이 부적합한

것으로 조사됐다(7). 최근에 들어 발기부전 치료제 성분의 분석에는 기존 HPLC 방법(8-10)과 GC 방법(11-13) 이외에 높은 정량성과 특이성을 갖는 LC-ESI-MS 방법(14-19) 등이 연구에 주로 활용되고 있다. 또한, 현행 식품공전에 수록되어 있는 부정유해물질의 분석은 HPLC/UV 방법을 제시하여 식품 중 유해물질을 분석하고 있다. 식물 추출물 및 해조류등이 포함된 시료의 경우 매트릭스가 복잡하고 자외선 흡광도가 높아 전처리한 시료의 희석 또는 함유된 당 성분을 제거하기 위한 추출을 해야하는 번거로움과 시간 및 인력이 필요하며, 다양한 성분을 함유한 건강기능식품의 경우 부정유해물질과 머무름 시간(R.T. retention time)이 동일한 위치에서 여러 성분들의 검출로 인하여 유해성분에 대한 정밀한 분석이 요구되고 있다. 따라서 본 연구의 목적은 기능성표방식품 중 합성 phosphodiesterase-5(PDE-5) inhibitors와 그의 유사체들을 포함한 부정유해물질에 대한 분석시간을 단축하고 또한 미량까지도 정확하게 검출할 수 있는 LC/MS/MS의 동시 분석법을 개발하는 것이며, 분석범위는 발기부전치료제 및 그 유사물질과 최근 추가된 디메칠실데나필과 잔소안트라필을 포함한 총 13종이다. 크로마토그래피 조건과 MS 조건을 최적화하기 위하여 이동상의 조성, pH 및 여러 매트릭스 조건을 비교 분석하였으며 개발한 LC/MS/MS방법의 검증을 위하여 정밀도, 정확도, 직선성, 회수율, 직선성 및 감도를 각각 측정하였고, 시중 유통 중인 147건의 건강기능식품 중의 부정유해물질의 혼입 실태를 조사하였다. 대상 시료는 건강기능식품 공전에 분류되어 있는 영양보충용

*Corresponding author: Hwa-Mi Lee, Hazard Substance Analysis Team, Center for Food and Drug Inspection, Gyeongin Regional Korea Food and Drug Administration, Juan-dong, Nam-gu, Incheon, 402-835, Korea
Tel: 82-32-450-3368
Fax: 82-32-442-4622
E-mail: lhm9904@hanmail.net
Received June 25, 2007; accepted July 29, 2007

제품, 인삼제품, 홍삼제품, 효소함유제품 등 주요 건강기능식품을 대상으로 하였으며, 이의 결과를 통하여 건강기능식품 및 기능성 식품의 부정유해물질 모니터링 방법 설정 시 기초 자료로 활용함으로써 건강기능식품 및 기능성식품 등의 안전성 확보에 기여하고자 하였다.

실험 방법

표준액

13종의 발기부전 치료제 성분을 비롯한 부정유해물질 표준품 (Table 1)은 식품의약품안전청으로부터 분양받은 시료로서 표준액은 표준품을 녹여 각각 1,000 ppm(MeOH 용액)의 농도로 제조한 후 희석하여 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용된 시약은 formic acid(99%, Fluka, Buchs, Germany), TFA(trifluoroacetic acid, 98%, Acros, NJ, USA)와 ammonium formate(99.995%, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)이며 용매로서 메탄올(HPLC grade, Burdick&Jackson, Seoul, Korea), ACN(Acetonitrile, HPLC grade, Burdick&Jackson)이 사용되었으며, 시료 전처리에 사용되는 물 및 이동상 증류수는 초순수를 사용하였다. 모든 실험기구는 질량분석기에 영향을 받지 않도록 PP, 테프론 재질 및 환경분석용의 초차 실험기구를 사용하였으며 초순수로 깨끗하게 씻은 상태로 사용하였다.

기기분석조건(LC/MS/MS)

기능성표방식품의 부정유해물질 분석을 위한 LC/MS/MS 분석법 확립을 위하여 각각의 200 ppb 표준용액을 먼저 질량분석기에 주입하여 Scan 모드에서 각 표준성분에 적합한 MS 모드와 분자이온 $[M+H]^+$ 나 $[M-H]^-$ 를 찾은 후(14,21) 그 모드에서 정량성이 뛰어난 이온과 모드를 선택하였다. 선택한 이온과 모드에서 충돌에너지를 가하여 분자이온을 딸이온(조개짐이온)으로 쪼개고 에너지별 조개짐과 딸이온의 세기를 비교하여 최적의 딸이온이 생성하는 충돌에너지 및 기타 파라미터를 저장하여 MRM 조건을 확립하였다. 이와 같이 확립한 각 이온의 MRM 조건과 HPLC의 분리 조건을 조합하여 13종 각각의 성분에 대한 매트릭스 효과 및 불순물에 대한 간섭을 확인한 후 시료 간 간섭과 매트릭스 효과를 최소화한 이온을 확인하였다. 이때 필요하면 MRM 조

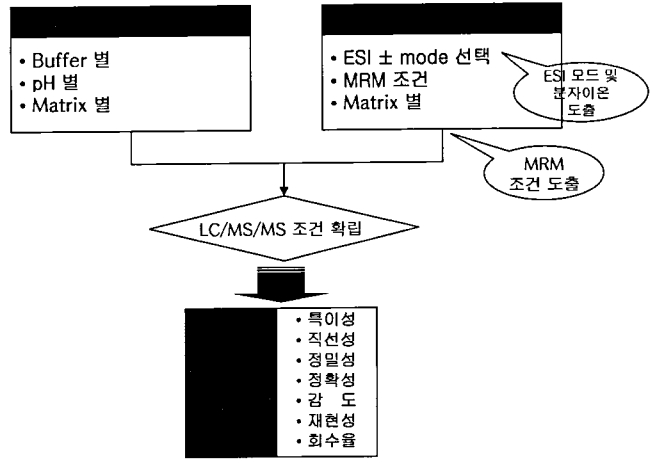


Fig. 1. Flow chart of Instrumental Procedure for LC/MS/MS.

건을 재설정하여 최종적인 MRM 조건 및 LC/MS/MS 조건을 확립하였다. 확립한 LC/MS/MS 방법을 검증하기 위하여 정밀성, 정확성, 회수율 그리고 감도 등에 관한 실험을 수행한 후 검체 분석을 통해 확립된 분석방법을 검증하였다(21). 검체 분석은 제품별 건강기능식품공전에 수록된 제품군 별로 다양하게 실험을 수행하였고 실험 진행 과정을 소개하면 Fig. 1과 같다.

시료 분석에 있어서 Liquid Chromatography(LC)는 Nanospace II (Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였다. CapcellPak C18 MG II (2.0 mm I.d. × 150 mm, 5 μm) (Shiseido) 를 사용하였으며 이동상으로는 분석조건을 최적화하기 위하여 최근 보고된 자료를 근거로 하여(8-9,15-17) 0.1% formic acid, 10 mM NH₄COOH 수용액, 0.05% TFA(Trifluoroaceticacid) 수용액과 염을 전혀 넣지 않은 수용액과 acetonitrile 용액을 사용하여 비교분석하였다. LC와 연결된 tandem mass spectrometer(MS/MS)는 API 4000Qtrap(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 모델을 사용하였으며 curtain gas와 collision gas로는 질소를 사용하였으며 데이터 처리 및 기기운용 프로그램으로서 Analyst 1.4.2(Applied Biosystems)를 사용하였다.

시료의 처리

정 · 과립 · 환제품은 시료의 균질화를 위해 막자사발로 갈아 시료를 채취하고 분말제품이나 액상제품은 일정량을 바로 취하

Table 1. Selective ion mode of 13 Compounds in ESI

No.	Compound	Q1	Formula	Exact Mass	Mode
1	Vardenafil	489.2	C23H32N6O4S	488.2	ESI Positive Mode
2	Hydroxyhomosildenafil	504.9	C23H32N6O5S	504.2	
3	Aminotadalafil	391.1	C21H18N4O4	390.1	
4	Hongdenafil	467.0	C25H34N6O3	466.3	
5	Sildenafil	475.1	C22H30N6O4S	474.2	
6	Homosildenafil	489.2	C23H32N6O4S	488.2	
7	Pseudovardenafil	460.1	C22H29N5O4S	459.2	
8	Hydroxyhongdenafil	483.2	C25H34N6O4	482.3	ESI Negative Mode
9	Udenafil	517.1	C25H36N6O4S	516.2	
10	Dimethylsildenafil	489.0	C23H32N6O4S	488.2	
11	Xanthoanthrafil	390.1	C19H23N3O6	389.1	
12	Icariin	675.2	C33H40O15	676.2	
13	Tadalafil	388.1	C22H19N3O4	389.1	

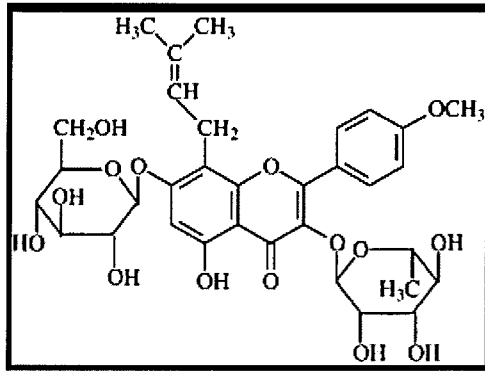


Fig. 2. Structure of Icariin.

고 캡셀제품은 캡셀안의 내용물을 취하여 실험을 하였으며 시료는 충분량을 취한 후 균질화하여 일정량의 무게 약 1g을 취한 후 70% MeOH 용액 25 mL로 30분간 추출(sonication)한 용액을 검출기의 감도를 고려하여 필요시 희석하여 LC/MS/MS 실험을 하였다. 보통 질량분석기의 검출이 ppb level이므로 지금까지의 검출 감도가 1,000 ppm 수준의 검체임을 고려할 때 질량분석기로의 주입은 오염과 직선성을 고려할 때 시료 전처리 후 100-1000배 정도의 희석이 요구되었다.

결과 및 고찰

MS 이온, MS 모드 및 MS/MS(MRM) 조건 확립

부정유해물질 13종의 최적의 MS 이온 모드 확립을 위해 13종의 각 표준용액(200 ppb)을 사용하여 ESI positive 모드 및 negative 모드, 각각에서의 MS 스펙트럼을 비교하였다. 예를 들어 $C_{33}H_{40}O_{15}$ 의 분자식을 갖는 이카린은 676.2의 분자량을 갖는 물질로서(Fig. 2) Fig. 3에서 보는 바와 같이 이카린의 ESI positive 모드 및 ESI negative 모드에서의 full scan spectrum에서는 각각 677.3 amu(atomic mass unit)과 675.4 amu의 분자이온이 관찰되었는데 그 세기는 ESI negative 모드의 675.4 amu의 이온이 positive 모드의 분자이온보다 2배 이상 큰 것을 알 수 있다. 이는 분자 구조(Fig. 2)에서 보듯이 이카린의 하이드록시기의 존재로 인하여 positive 분자이온 $[M+H]^+$ 인 677.3보다 negative 분자이온 $[M-H]^-$ 인 675.4의 형성이 더 자유로워 질량분석기에서의 이온화 세기가 2배 이상 높기 때문인 것으로 추정할 수 있다. 즉, 이카린의 경우는 ESI negative 모드에서 정량감도가 더 뛰어난 것을 알

수 있으며 이카린은 시료 간의 간섭 및 매트릭스 효과가 없는 한 ESI negative 모드에서 분석하는 것이 타당함을 알 수 있었다. Table 1에 부정유해물질 13종의 각각의 MS 이온, 분자식, Exact Mass 및 각 이온에서 더 뛰어난 정량성을 보이는 MS 이온 모드를 정리하였다. 이때 Exact Mass라 함은 각각의 분자의 실제 분자량에 해당하며 일반적으로 알려진 동위원소의 함유량을 고려한 평균 분자량과는 구별된다.

부정유해물질 13종의 동시 정성 및 정량분석을 ppb 수준까지 수행하기 위한 MRM 모드를 확립하기 위해 Table 1에서 선택한 분자이온에 해당하는 각 MS 이온의 해당 분석 모드(MS 이온 모드)에서의 조개짐 이온(daughter ion)을 확인하고 조개짐 이온 중 이온세기가 가장 큰 이온에 CE(Collision Energy) 튜닝을 적용하여 MRM 조건을 위한 파라미터를 최적화하였다(Table 2). MRM 모드는 구조가 다른 분자의 조개짐 에너지와 조개짐 패턴의 차이를 이용하여 분자의 확인과 정량을 하는 기능을 수행함으로써 정량성과 분자에 대한 특이성을 제공하는 것으로 알려져 있다(22). 예를 들어 Table 1에서 보는 바와 같이 바데나필(Vardenafil), 호모실데나필(Homosildenafil) 및 디메틸실데나필(Dimethylsildenafil)의 경우 Exact Mass는 모두 488.2로서 Single 저분해능 질량분석기에서는 동일한 이온으로 간주할 수 있으므로 분자량은 같으나 작용기의 위치 등의 구조가 다른 분자들 간의 구별을 위해서 분자 특이성을 제공하고, 또한 방해물질의 제거에 따른 감도가 높은 MRM 모드가 필요하다. 본 연구에서 MRM 조건의 최적화는 한개 분자 이온에서 조개짐 이온을 3개 이상 선택한 후 그 중 실제 분석에서 매트릭스 효과가 적고 시료간의 간섭이 없는 두 가지 조개짐 이온만을 골라서 그 조개짐 이온 생성에 필요한 기기 파라미터를 저장하는 방법으로 하였다. 즉 Tandem MS의 Q1에서 분자이온을 선택하고 Q2에서 그 분자이온을 에너지를 가하여 조개지게 한 후 Q3에서 조개짐 이온을 선택하여 성분 확인과 정량 기능을 갖는 MRM 모드(23)를 적용하였다. 예를 들어 타다라필의 경우 앞에서 설명한 이카린과 같이 ESI positive 모드보다 ESI negative 모드에서 2배 이상의 분자이온 세기를 나타내며 MRM 모드에서는 분자이온 388을 충돌에너지(CE), -65 Volts에서 조개짐 이온 262 amu, 232 amu를 나타내었다(Table 2).

LC/MS/MS 조건 확립

확립한 MS조건과 결합하는 HPLC 분석조건의 최적화는 부정유해물질간의 분리와 matrix 효과를 최소화 하는 것을 목표로 하여 수행하였다. 이를 위해 자료조사를 통해 얻은 이동상에 대한 정보(8-10,14-19)와 실제 검정 시 사용되는 용매를 고려하여 이동

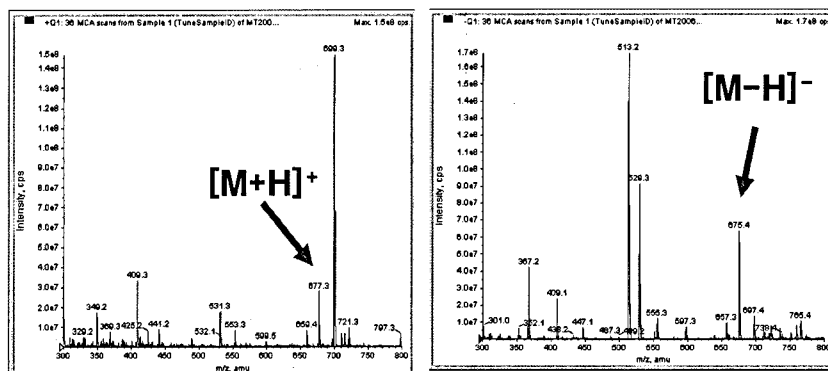


Fig. 3. The full scan spectrum of Icariin at the ESI positive (left) and negative (right) mode.

Table 2. MRM condition of 13 compounds

No.	Compound	Q1	Q3	DP*	CE**	CXP***
1	Vardenafil	489.2	151.3	70	67	8
			169.3	70	59	14
2	Hydroxyhomosildenafil	504.9	487.2	101	33	12
			129.1	101	41	20
3	Aminotadalafil	391.1	269.0	81	19	20
			169.0	81	47	14
4	Hongdenafil	467.0	111.0	146	45	16
			127.3	146	47	10
5	Sildenafil	475.1	100.0	131	39	8
			283.1	131	53	16
6	Homosildenafil	489.2	72.1	136	95	10
			99.3	136	57	14
7	Pseudovardenafil	460.1	151.2	151	59	8
			169.2	151	59	10
8	Hydroxyhongdenafil	483.2	127.0	126	43	20
			143.0	126	45	22
9	Udenafil	517.1	283.2	96	65	24
			325.3	96	51	16
10	Dimethylsildenafil	489.0	113.3	120	43	18
			283.1	120	55	14
11	Xanthoanthrafil	390.1	151.0	76	21	26
			107.1	76	73	16
12	Icarin	675.2	513.1	-65	-14	-9
			367.2	-65	-42	-19
13	Tadalafil	388.1	262.0	-95	-26	-5
			232.0	-95	-52	-17

*: Declustering Potential

**: Collision Energy

***: Collision Cell Exit Potential

상과 pH와의 조성을 변화해 가면서 실험을 수행하였다. 기능성 표방식품의 부정유해물질의 분석을 위한 이동상은 기능성표방식품 중 의약품 성분 분석(24)에 수록된 부정유해물질의 분석을 위해 사용된 탈이온수와 아세트니트릴을 사용하되 참고 논문(8-10, 14-19)을 근거로 하여 MS내에서 시료의 휘발성을 돕고 이온화율을 증가시키기 위한 버퍼의 비교분석을 실시하였다. 사용된 버퍼는 Table 3과 같이 0.05% THF(Trifluoroacetic acid), 0.1% formic acid, 10mM NH₄COOH 용액이며 버퍼가 아닌 용액과 비교하여 실험을 수행하였으며 각 용액별 pH는 1.2, 3.4, 7.0 및 6.8 이었다. 각 이동상 조건에서 부정유해물질의 이온화 세기를 비교해 본 결과 산성조건에서는 Fig. 4에서와 같이 각 성분의 이온화율과 분리정도가 낮고 pH 7 정도인 10mM NH₄COOH 용액과 버퍼가 아닌 이동상에서 이온화율과 분리가 좋은 크로마토그램을 얻었다. 여기서는 THF가 사용된 버퍼의 이동상의 크로마토그램은 나타내지 않았다. Fig. 4는 바데나필, 하이드록시호모실데나필 및 아미노타다라필의 MRM 조건(Table 2)과 Table 3에서 나타낸 이동상 조건을 이용하여 얻은 크로마토그램을 보여주고 있다.

산성조건인 0.1% HCOOH 수용액을 사용한 이동상인 경우 위에서 언급한 바데나필을 포함한 3가지 성분의 분리가 이루어지지 않고 특히 바데나필의 경우 심한 우측 테일링이 생겼다. 버퍼를 사용하지 않은 크로마토그램의 경우 바데나필과 하이드록시

호모실데나필이 거의 겹쳐 있으며 아미노타다라필은 2개의 피크로 보였으나, 10mM NH₄COOH를 넣은 이동상을 통해 얻은 크로마토그램은 3가지 성분이 분리도 1.5 이상으로 분리되어 있고 이온세기를 비교해보아도 바데나필의 경우 489.2 → 151.3 이온세기가 1.0e6으로서, 버퍼를 사용하지 않은 이동상에서 얻은 크로마토그램의 이온세기 7.9e5에 비해 1.2배 이상 높았다(data not shown). 산성조건에서는 호모실데나필과 실데나필의 경우 테일링이 발생하고 버퍼를 넣지 않은 이동상에서는 극성이 크면 머무름이 없고(data not shown), 10mM NH₄COOH를 넣은 이동상을 통해 얻은 크로마토그램에서는 호모실데나필, 실데나필 등의 성분이 분리가 잘 이루어지고 이온세기도 산성조건인 이동상에서 보다 10mM NH₄COOH를 넣은 이동상을 통해 얻은 크로마토그램에서 이온세기가 높음을 알 수 있었다(data not shown). 이는 발기부전치료제 성분의 구조 특성상 질소원자의 존재로 암모늄염이 쉽게 생성될 수 있음으로 설명되어 질 수 있다.

ESI negative 모드에서 타다라필의 경우 산성 조건보다 중성에 가까운 pH나 중성용액에서 388 → 262의 음이온 세기가 3배 이상 강함을 볼 수 있다(Fig. 5). 또한 버퍼를 넣지 않은 이동상과 10mM NH₄COOH를 넣은 이동상의 경우 타다라필 이온의 세기는 거의 차이가 없는 것으로 보아 이는 산성 조건에서보다 중성 조건에서 음이온의 형성이 용이한 것으로 설명되어질 수 있다.

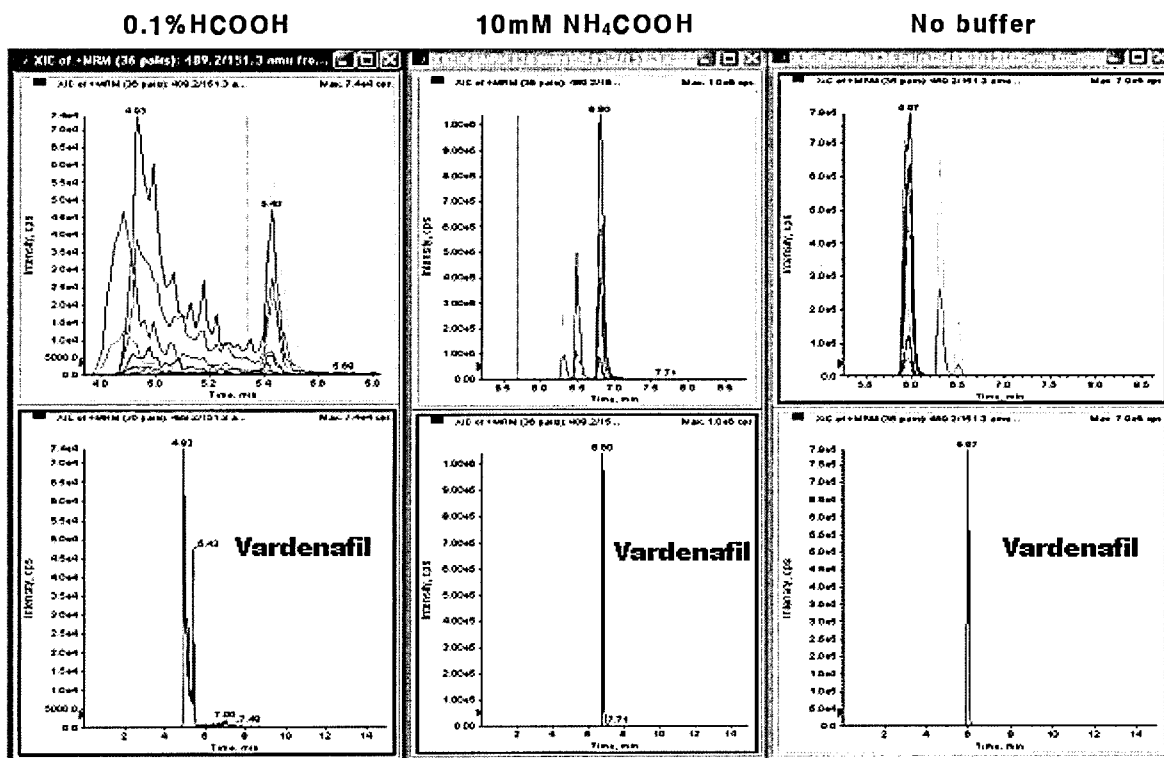


Fig. 4. MS chromatogram of Vardenafil, Hydroxyhomosildenafil and Aminotadalafil (above) and extract ion chromatogram of Vardenafil (below) at the various buffer conditions.

Table 3. Buffers, pH and mobile conditions of HPLC

Buffer in DI water	pH	Mobile	Mobile condition			
			Time	Flow rate	B%	A%
THF 0.05%	1.2	A: Buffer in Water B: Acetonitrile	Init	250.0	5.0	95.0
			3.0	250.0	5.0	95.0
			3.5	250.0	20.0	80.0
			4.0	250.0	70.0	30.0
			12.0	250.0	95.0	5.0
Formic acid 0.1%	3.4	A: Buffer in Water B: Acetonitrile	13.0	250.0	5.0	95.0
			15.0	250.0	5.0	95.0
10 mM NH ₄ COOH	7.0					
No buffer	6.8					

이러한 결과를 바탕으로 이동상 조건은 10 mM NH₄COOH가 들어있는 이동상을 사용하여 LC 분리조건을 정하였으며 실제 시

료 매트릭스 및 불순물의 간섭을 최소화하는 이동상의 용리 조건을 최적화하였다(Table 3).

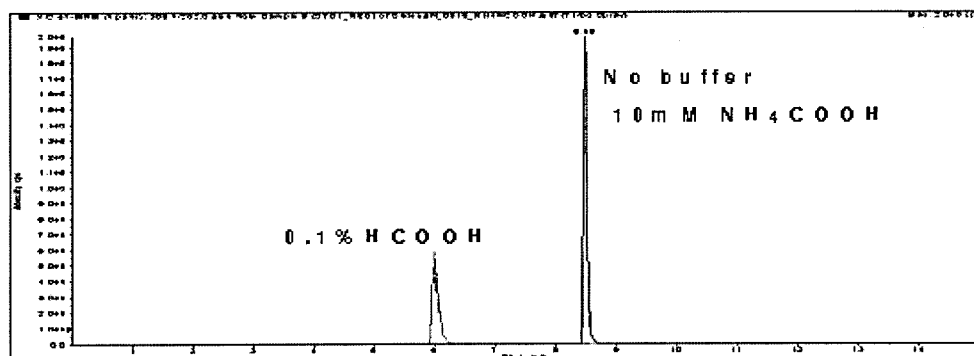


Fig. 5. Comparison of Tadalafil 388->262 ion intensity at the various buffer conditions.

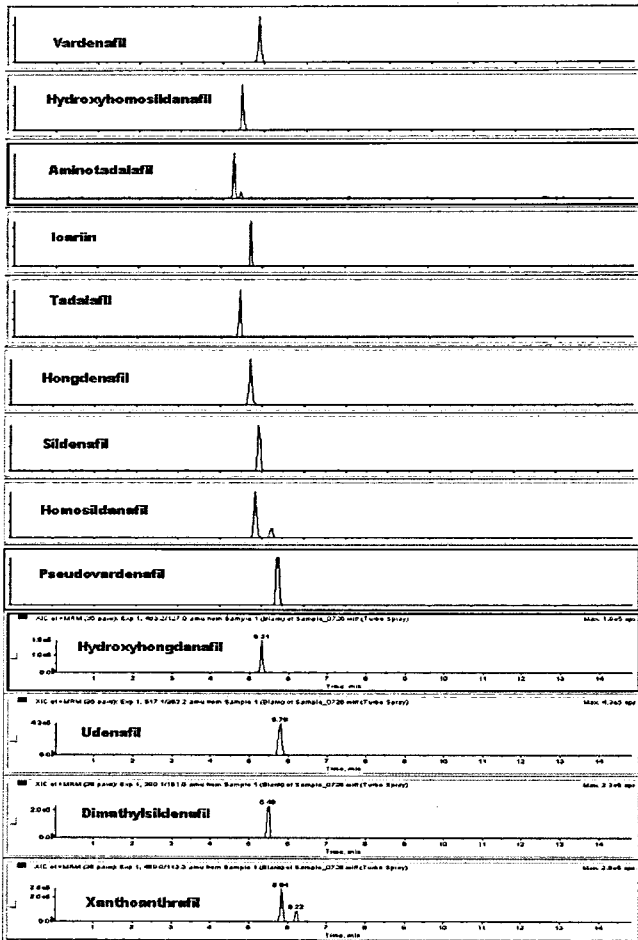


Fig. 6. MS chromatogram of acquired solution spiked 13 standards into blank sample.

분석 조건의 검증

분석 조건의 특이성을 위해 본 연구의 시료의 전처리법으로 검체를 처리하여 LC/MS/MS로 분석하였을 때 부정유해물질이 당과 같은 극성인 물질과의 상호작용이 없도록 초기 머무름 시간

2분을 두어 부정유해물질이 4분 이후 8분 이내에 검출되도록 조건을 설정하였다(Fig. 6). 부정유해물질 13종이 들어있지 않은 블랭크 검체의 크로마토그램(Fig. 7)과 비교하여 블랭크 때 확립한 LC/MS/MS 분석조건에서 부정유해물질 13종에 대한 분리 상태가 양호함을 알 수 있다.

분석조건의 직선성 실험을 위해 기능성표방식품 중 스피루리나 제품인 시료 1.000 g에 500, 1000, 2000 ng/mL 표준액을 가한 후 시료 전처리하여 LC/MS/MS로 분석하였을 때 바데나필의 경우 10-500 ng/mL 범위에서 양호한 직선성($r^2=0.9978$)을 나타내었으며 나머지 12종의 결과에서도 평균 상관계수(r^2)는 0.9852로서 직선성을 나타내었다(Table 4). 기존의 HPLC/UV 방법은 ppm level에서 분석을 수행하는 반면 본 연구의 LC/MS/MS 방법은 ppb level 까지 정량성을 보이므로 이는 미량의 유해물질이 혼입되었을 경우에도 검출이 용이하게 될 수 있음을 시사해 준다.

정밀성, 정확성 및 감도(검출한계, 정량한계)의 확인을 위해 부정유해물질 13종의 표준용액을 농도별(50, 100, 200 ng/mL)로 처리한 검체를 사용하였다. 평가는 HPLC상에서 다양한 성분의 검출이 나타나는 해조류 제품인 스피루리나 제품에 표준품을 주입한 검체를 농도별로 반복(3-5번) 시행하여 분석하였다. 정밀성은 각 부정유해물질 표준품 면적의 표준편차를 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율 CV(Coefficient of Variation, %)로서 구하였고 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율(%)로 구하였다(Table 4). 감도는 크로마토그램상에서 얻어진 두 이온 peak의 신호 대 잡음비(S/N ratio)를 3.3으로 검출한계로 하고, 신호 대 잡음비 10을 정량한계로 하여 구하였다(Table 4).

부정유해물질 13종의 회수율은 각 스피루리나 제품, 식물추출물 함유제품, 멀티비타민 시료에 표준액을 가하여 시료 전처리를 하여 최종 농도가 50 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL이 되도록 메탄올을 가한 용액의 농도에서 얻은 데이터에서의 피크면적과 이에 상응하는 농도로 이동상에 직접 용해시켜 얻은 부정유해물질의 피크 면적을 비교하여 산출하였다(25). 그 결과 바데나필의 스피루리나 제품에서의 평균 회수율은 각각 96.1%이었으며 식물추출물과 멀티비타민에서의 평균회수율은 각각 94.3%, 96.9%이었다. 나머지 12종에 대한 매트릭스별 평균 회수율은 87% 이상으로 매트릭스별 회수율의 차이는 나타나지 않고 있음을 관찰하

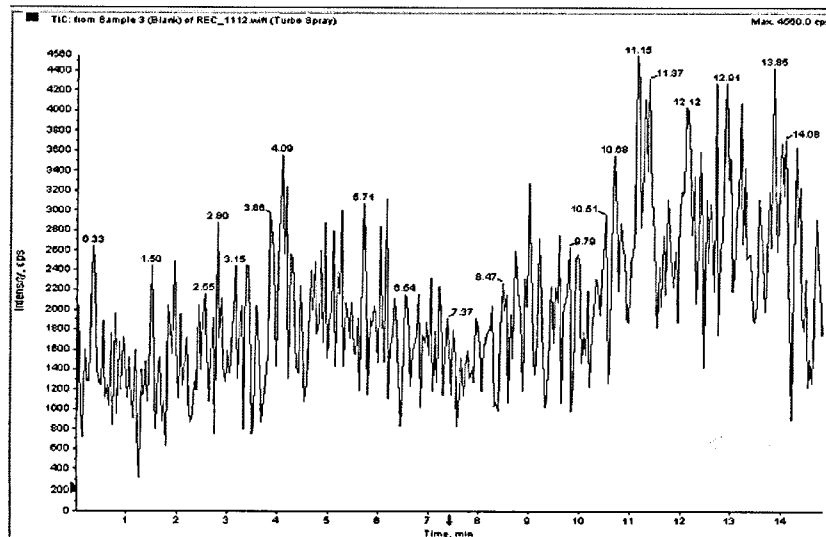


Fig. 7. Blank chromatogram.

Table 4. Validation data of 13 forbidden compounds*

No.	Compound	R ²	Overall Mean CV (%)	Overall Mean Accuracy (%)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
1	Vardenafil	0.9978	5.0	100.9	0.5	1.0
2	Hydroxyhomosildenafil	0.9882	4.2	97.6	2.0	5.0
3	Aminotadalafil	0.9710	5.2	87.7	2.0	5.0
4	Hongdenafil	0.9972	3.4	98.5	0.1	0.5
5	Sildenafil	0.9872	4.5	98.8	0.5	1.0
6	Homosildenafil	0.9743	5.4	97.9	0.5	2.0
7	Pseudovardenafil	0.9609	7.0	97.4	0.1	0.1
8	Hydroxyhongdenafil	0.9970	4.6	100.2	0.5	1.0
9	Udenafil	0.9955	4.5	99.4	0.2	0.5
10	Dimethylsildenafil	0.9718	7.0	98.2	0.5	1.0
11	Xanthoanthrafil	0.9886	6.1	99.1	1.0	2.0
12	Icariin	0.9998	0.0	99.8	5.0	10.0
13	Tadalafil	0.9790	0.0	97.9	0.2	0.5
	Overall Mean	0.9852	4.4	98.0		

*: Overall Mean Data at 50.0, 100.0, 200.0 ng/mL solns (n=9).

였다(data not shown). 이는 이미 보고된 기능성표방식품의 유해물질의 전처리를 한 결과의 회수율 95-109%(26)와 천연식이보충용 제품에서의 회수율 63-100%(19) 그리고 식물치료제 중의 회수율 100% 정도(14)와 유사한 결과를 보여주고 있으며 이의 결과를 바탕으로 유추하여 볼 때 본 연구의 시료 전처리법 즉, 메탄올로 단순 추출로 인한 회수율의 저하는 거의 없음을 알 수 있다. 따라서 기능성표방식품 중 부정유해물질 13종에 대한 본 HPLC/MS/MS 분석법은 기능성표방식품 중 부정유해물질 검사 방법에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 회수율을 갖고 있으며, 기존의 HPLC 방법이 시료의 매트릭스로 인한 방해효과를 제거하기 위한 추출이 필요하지 않아 분석시간을 단축함으로써 생산성 및 데이터의 질이 높아짐을 알 수 있다.

본 연구에서 확립한 LC/MS/MS 법을 사용하여 시중 유통 중인 147건의 건강기능식품 중의 부정유해물질의 검출 여부를 모니터링한 결과 유해물질이 검출되지 않았다.

요 약

부정유해물질 총 13종에 대한 신속하고 고감도의 LC-ESI-MS-MS 동시분석 방법을 개발하였으며 바데나필을 포함한 11종은 ESI positive 모드에서 타다라필을 포함한 2종은 ESI negative 모드에서 검출하는 방법으로서 시료 전처리는 간단히 메탄올 추출법을 사용하였다. 기능성표방식품 중 부정유해물질의 확인은 한번 시료를 주입함으로써 15분 이내에 13종의 분석이 가능하고 크로마토그램의 분리는 아세트나이트릴과 10 mM ammonium formate가 들어있는 탈이온수를 이용한(pH 7.0) 기울기 용매 조건으로 수행하였다. 확립한 13종에 대한 부정유해물질 분석방법은 검출한계(LOD)는 0.1-5 ng/mL이고, 정량한계(LOQ)는 0.1-10 ng/mL로서 평균 상관계수(r^2)는 0.9853로서 ppb 수준에서 정량성을 가지며 회수율은 87.5-98.5%, 변동계수는 15% 이하임을 확인할 수 있었다. 또한 확립한 시험방법 LC/MS/MS를 이용하여 147건의 기능성표방식품 중의 부정유해물질의 검출을 실시한 결과, 유해물질의 검출이 나타나지 않음을 알 수 있었다. 기능성표방식품 중의 실테나필과 그 유사물질을 포함한 13종의 부정유해물질에 대한 스크리닝 방법으로 MRM 모드를 이용한 LC-ESI-MS-MS 방

법을 개발하였으며, 이는 유해물질에 대한 고성능액체크로마토그래피/자외선흡광광도법의 선택성등의 제한성을 극복한 부정유해물질의 스크리닝에 신속하고 미량까지 검출 가능한 가치 있는 방법임을 확인할 수 있었다.

문 헌

1. Aruoma OI. The impact of food regulation on the food supply chain. *Toxicology* 221: 119-127 (2006)
2. Dwyer JT, Allison DB, Coates PM. Dietary supplements in weight reduction. *J. Am. Diet. Assoc.* 105: 80-86 (2005)
3. Morreale SL, Schwartz NE. Helping Americans eat right: developing practical and actionable public nutrition education messages based on the ADA survey of american dietary habits. *J. Am. Diet. Assoc.* 95: 305-308 (1995)
4. Kim MH, Chung SY, Sho US, Kim MC, Kim CM. Establishments of lead standards through monitoring heavy metals in calcium, chitosan, and propolis health foods. *Korean J. Food Sci. Technol.* 33: 525-528 (2001)
5. Menrad K. Market and marketing of functional food in europe. *J. Food Eng.* 56: 181-188 (2003)
6. KFPA. Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 9-10 (2006)
7. KFPA. PDE-5 Inhibitors and their analogues detection survey. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 2-4 (2006)
8. Cooper JDH, Muirhead DC, Taylor JE, Baker PR. Development of an assay for the simultaneous determination of sildenafil (Viagra) and its metabolite (UK-103,320) using automated sequential trace enrichment of dialysates and high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B* 701: 87-95 (1997)
9. Al-Ghazawi M, Tutunji M, AbuRuz S. Simultaneous determination of sildenafil and N-desmethyl sildenafil in human plasma by high-performance liquid chromatography method using electrochemical detection with application to a pharmacokinetic study. *J. Pharmaceut. Biomed.* 43: 613-618 (2007)
10. Choi HC, Kang SJ, Yun MO, Park SA, Kim HJ, We SS, Kim JY, Cha KW. Determination of sildenafil and its related substances using high performance thin layer chromatography. *Anal. Sci. Tech.* 16: 32-38 (2003)
11. Bogusz M, Al-Tufail M, Hassan H. How natural are 'natural herbal remedies'? A Saudi perspective. *Adv. Drug React. Toxicol. Rev.* 21: 219-229 (2002)
12. Liu SY, Woo SO, Koh HL. HPLC and GC-MS screening of Chinese proprietary medicine for undeclared therapeutic substances.

- J. Pharmaceut. Biomed. 24: 983-992 (2001)
13. Saisho K, Scott KS, Morimoto S, Nakahara Y. Hair analysis for pharmaceutical drugs. II. Effective extraction and determination of sildenafil (Viagra?) and its N-desmethyl metabolite in rat and human hair by GC-MS. *Biol. Pharm. Bull.* 24: 1384-1388 (2001)
 14. Abdel-Hamid M. Determination of sildenafil, tadalafil, and vardenafil in tablets and adulterated herbal products by ESI-MS-MS. *J. Liq. Chromatogr. R. T.* 29: 591-603 (2006)
 15. 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)
 16. Wang Y, Wang J, Cui YJ, Paul F, Jing G. Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of sildenafil in human plasma. *J. Chromatogr. B* 828: 118-121 (2005)
 17. Travqui A, Ludes B. HPLC-MS for the Determination of sildenafil citrate (Viagra) in biological fluids. application to the salivary excretion of sildenafil after oral intake. *J. Anal. Toxcol.* 27: 88-94 (2003)
 18. Myung SW, Park SH, Cho HW. Analysis of sildenafil and its analogues by LC/MS/MS. *Anal. Sci. Tech.* 16: 488-498 (2003)
 19. 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. Pharmaceut. Biomed.* 41: 554-564 (2006)
 20. Lee MS. *Spectroscopic Methods of Analysis-Mass Spectrometry: Encyclopedia of Pharmaceutical Technology 2002.* Milestone Development Services, Newtown, PA, USA (2002)
 21. Jang DJ, Jeong EJ, Lee HM, Kim BC, Lim SJ, Kim CK. Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. *Eur. J. Pharm. Sci.* 28: 405-411 (2006)
 22. Daeseleire E, Ruyck HD, Renterghem RV. Rapid confirmatory assay for the simultaneous detection of ronidazole, metronidazole and dimetridazole in eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analyst* 125: 1533-1535 (2000)
 23. Koesukwiwat U, Jayanta S, Leepipatpiboon N. Validation of a liquid chromatography-mass spectrometry multi-residue method for the simultaneous determination of sulfonamides, tetracyclines, and pyrimethamine in milk. *J. Chromatogr. A* 1140: 147-156 (2007)
 24. KFDA. *Analysis of medicien in health functional food.* Korea Food and Drug Administration. Seoul, Korea. pp. 75-88 (2005)
 25. Kim CK, Yeon KJ, Ban EM, Hyun MJ, Kim JK, Kim MK, Jin SE, Park JS. Narrow-bore high performance liquid chromatographic method for the determination of cetirizine in human plasma using column switching. *J. Pharmaceut. Biomed.* 37: 603-609 (2005)
 26. Choi DM, Im MH, Kyungjin Lee, Kwon KJ, Jeong JY, Park GS, Hong MK, Lee CW. Determination anti-impotence drug-like compounds in Food Anal. *Sci. Tech.* 17: 520-526 (2004)