

시판 기능성식품으로부터의 타다라필 유도체 부정첨가물질의 분리 및 구조규명

백 두 종[#]

상명대학교 자연과학대학 화학과

(Received March 31, 2010; Revised May 17, 2010; Accepted May 28, 2010)

Isolation and Identification of an Unauthorized Tadalafil Analogue in a Commercial Functional Food

Du-Jong Baek[#]

Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

Abstract — High-performance liquid chromatography (HPLC) screening method revealed that a propolis product marketed as a functional food contained an undeclared substance similar to tadalafil, the active ingredient of the prescription drug Cialis® approved for the treatment of male erectile dysfunction. In order to identify the illegal additive, the propolis product was extracted with methylene chloride, and the extract was purified further using semipreparative HPLC. The chemical structure of the isolated substance was elucidated based on IR, LC/MS-ESI, and ¹H- and ¹³C-NMR spectroscopy, which showed the characteristics similar to tadalafil. The only difference was the substitution of the methyl group at the piperazinedione ring of tadalafil to the amino group of the identified illegal additive.

Keywords □ functional food, HPLC screening, illegal additive, tadalafil

타다라필(tadalafil)은 Eli Lilly 사에 의해 개발되어 시판되고 있는 발기부전치료제 시알리스(Cialis)®의 주성분으로서, 해면체 내에서 c-GMP의 분해 및 평활근 수축을 통해 발기부전에 이르게 하는 효소인 phosphodiesterase-5(PDE-5)의 억제제로 작용한다.¹⁾ 이 약물은 니트로글리세린(nitroglycerin), 질산이소소르비드(isosorbide dinitrate) 등의 질산염 제제를 복용하는 고혈압 환자나 당뇨병 환자에게는 처방이 금지되어 있는데 이 두 가지 약물을 동시에 투여하면 급격한 혈압강하를 유발할 수 있고²⁾ 따라서 타다라필을 함유하는 약물은 의사의 처방전 없이는 판매될 수 없다.

식품위생법의 규정에 의하면 기준 · 규격이 고시되지 아니한 화학적 합성품을 식품첨가물로 사용하거나 이를 함유한 식품을 판매의 목적으로 제조 · 유통하지 못하도록 되어 있지만,³⁾ 최근 기능성식품에 발기부전치료제 성분을 첨가하여 시판하는 사례가 보고되어 국민 건강을 위협하고 있다. 따라서 부정식품의 섭취에 의한 발기부전치료제의 오남용을 방지하기 위해서 이러한 부

정첨가물질을 검출할 수 있는 HPLC 동시분석법이 개발되었고^{4,5)} 2002년 수입 주류로부터 타다라필을 검출한 이래 이 첨가물질을 함유한 여러 건의 부정식품을 적발하였다. 그 후 부정식품 제조/수입업체에서는 이러한 검색시스템을 회피하기 위한 목적으로 타다라필 화학구조의 단순한 변형을 가한 유사 첨가물질을 사용하고자 하는 시도가 있었는데 이러한 타다라필 유사물질은 그 안전성이 아직 입증되지 않았기 때문에 이 화학물질을 함유한 기능성 식품은 인체에 위해를 가할 위험이 훨씬 더 크다고 할 수 있다. 실제로 최근에 타다라필 유사물질을 함유한 프로폴리스(밀랍) 부정식품이 HPLC 검색시스템에 의해 적발되었는바, 신규 부정첨가물을 규명하기 위해 분리정제 후 분광학적 방법에 의해 그 미지물질의 화학구조를 결정하였으므로 그 결과를 여기에 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기

미지물질의 추출 분리에 사용된 모든 용매는 Fisher Scientific의 HPLC 금 용매를 사용하였다. HPLC 분석은 Waters 2690 및 996 photodiode array detector에 의해 수행되었다. Thin-layer

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-2287-5143 (팩스) 02-2287-0070
(E-mail) djbaek@smu.ac.kr

chromatography(TLC)는 E. Merck silica gel 60 F-254 코팅유리판(0.25 mm)을 사용하였고 자외선, 요오드, phosphomolybdic acid, anisaldehyde로 발색하여 관찰하였다. 용점은 Thomas-Hoover 모세관 용점 측정기로 측정하였고 보정하지 않았다. UV 스펙트럼은 Varian CARY 100 Spectrometer로 측정하였다. IR 흡수스펙트럼은 KBr pellet을 사용하여 Perkin-Elmer FTIR 1750 Spectrometer로 측정하였으며 중요 흡수대를 cm^{-1} 로 표기하였고 그 크기를 다음과 같이 약자로 표기하였다: s, strong; m, medium; w, weak. NMR 스펙트럼은 Bruker Avance 400 Spectrometer(^1H 및 ^{13}C , 각각 400 MHz 및 100 MHz)에서 DMSO- d_6 를 용매로 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ 척도로서 ppm으로 표기하였고 중첩피크는 다음과 같이 약자로 표기하였다: s, singlet; d, doublet; dd, doublet of doublets; t, triplet; q, quartet; m, multiplet; bs, broad singlet. Electrospray ionization mass spectrum(ESI-MS) data는 VG Micromass Autospec에 의해 얻었고, m/z (base peak을 100으로 한 상대적 크기)의 형태로 표기하였다.

추출 및 분리 정제

프로폴리스 부정식품 10 캡슐(500 mg/캡슐)의 내용물을 물 100 mL에 녹이고 methanol 350 mL를 가한 다음 초음파 진탕추출 후 여과하였다. 여액에 1% 중탄산나트륨 용액 5 mL를 가하고 methylene chloride 250 mL로 3회 추출한 다음 유기층을 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고 감압 농축하였다. 잔사를 methanol 15 mL에 녹이고 membrane filter로 여과한 다음 여액을 semipreparative HPLC로 정제하였다. 정제용 컬럼으로는 μ Bondapak C_{18} column(7.8×300 mm, 5 μm)을 사용하였고 전개용매는 acetonitrile-water-trifluoroacetic acid(90 : 10 : 0.1)를 5 mL/min의 속도로 사용하였다. 얻어진 분획을 동결건조하여 무색결정의 순수 미지물질 20 mg을 얻었다: mp 272~278°C; UV λ_{max} (Methanol) 285 nm; IR(KBr) 3436(s), 2896(w), 1655(s), 1499(w), 1415(w), 1320(w), 1240(m), 1038(w), 925(w), 739(w); ^1H NMR(DMSO- d_6) δ 3.00(1H, dd, $J=15.4$, 11.9 Hz, C_{12} -H), 3.58(1H, dd, $J=15.7$, 4.2 Hz, C_{12} -H), 3.97(1H, d, $J=17.1$ Hz, C_3 -H), 4.27(1H, d, $J=17.2$ Hz, C_3 -H), 4.44(1H, dd, $J=11.6$, 3.5 Hz, C_{12a} -H), 5.13(2H, s, NH_2), 5.93(2H, s, C_{20} -H), 6.10(1H, s, C_6 -H), 6.78(1H, d, $J=8.0$ Hz, C_{18} -H), 6.82(1H, dd, $J=8.2$, 1.4 Hz, C_{19} -H), 6.88(1H, d, $J=1.2$ Hz, C_{15} -H), 7.02(1H, t, $J=8.4$ Hz, C_{10} -H), 7.06(1H, t, $J=7.1$ Hz, C_9 -H), 7.30(1H, d, $J=7.9$ Hz, C_8 -H), 7.56(1H, d, $J=7.7$ Hz, C_{11} -H), 11.02(1H, bs, N_7 -H); ^{13}C NMR(DMSO- d_6) δ 23.5(C_{12}), 53.3(C_3), 55.4(C_{12a}), 55.6(C_6), 100.9(C_{20}), 104.8(C_{11b}), 106.9(C_{15}), 108.3(C_{18}), 111.3(C_8), 118.1(C_{11}), 118.9(C_{10}), 119.3(C_{19}), 121.2(C_9), 125.7(C_{11a}), 134.0(C_{6a}), 136.2(C_{14}), 137.1(C_{7a}), 146.0(C_{17}), 147.0(C_{16}),

164.6(C_4), 166.3(C_1); Mass m/z 391(M+1, 100), 289(12), 269(30), 262(21), 204(12), 169(6).

실험결과 및 고찰

C_{18} reversed-phase column에 의한 HPLC 분석법은 식품의약 품안전청에서 기능성식품 및 건강보조제의 부정첨가물질을 검색하기 위해 일반적으로 사용하는 방법이다.⁶⁾ 이 방법으로 프로폴리스 추출물을 검색한 결과, 이전에 보고되지 않았던 미지 화합물이 검출되었고 타다라필과 유사한 머무름시간을 보였다. 더욱 이, 정체한 이 화합물의 UV 스펙트럼은 methanol 용액에서 λ_{max} 285 nm의 값이 얻어졌고 타다라필의 스펙트럼과 동일하였다. 따라서 이 미지물질은 화학구조 및 물리적 성질에서 타다라필과 유사하리라 추정되었다.

이 화합물의 화학구조는 IR, MS 및 NMR 분광학에 의해서 다음과 같이 결정되었다. IR 스펙트럼은 amino(3436 cm^{-1}), amide (1655 cm^{-1}), aromatic(1499, 1415 cm^{-1}) 및 ether group(1240 cm^{-1})의 특징적인 흡수대를 나타냈다. 이 미지화합물에 1차아민이 존재한다는 점은 ninhydrin test에 의해 확인되었는데 물질분리 후 TLC plate에서 뚜렷한 청갈색 반점을 보였다. 이 미지물질의 분자구조는 LC/MS-ESI 및 fragmentation pattern에서 추가로 분석되었는데 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 가 m/z 391에서 얻어졌고 fragment는 269, 204, 169에서 얻어졌다(Fig. 1). 이 질량 스펙트럼은 타다라필($[\text{M}+\text{H}]^+$ 390; fragment 268, 204, 169)과 유사하고, 미지물질과 타다라필의 차이는 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 의 391 대 390, 그리고 fragment 269 대 268의 1 mass unit 차이가 유일하였다. 이 1 mass unit 차이는 타다라필에 존재하는 methyl(CH_3 -) group^o 미지물질에서 amino(NH_2 -) group^o로 치환되어서 유발된 결과라고 추정되었다.

이 미지 화합물의 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 얻었고 이 화합물의 구조와 번호를 Fig. 2에 나타내었다. ^1H -NMR 스펙트럼은 다음과 같은 특징적인 peak들을 보이고 있다: δ 5.13(2H, s), piperazinedione의 질소와 연결된 amino group; δ 11.02(1H, bs), indole NH; δ 5.93(2H, s), 3,4-methylenedioxyphenyl ring의 methylene; δ 6.10(1H, s), aromatic ring 및 질소와 연결된 C-6 methine; 3.97(1H, d, $J=17.1$ Hz) 및 4.27(1H, d, $J=17.2$ Hz), piperazinedione ring의 C-3 methylene; δ 3.00(1H, dd, $J=15.4$, 11.9 Hz) 및 3.58(1H, dd, $J=15.7$, 4.2 Hz), indole ring 옆의 C-12 methylene, 여기서 15 Hz의 coupling constant는 상호간의 coupling^o이고 12 Hz 및 4 Hz는 다음의 δ 4.44 peak과의 coupling^o이다; δ 4.44(1H, dd, $J=11.6$, 3.5 Hz), C-12a methine; 기타 δ 6.78~7.56, aromatic proton. ^{13}C -NMR 스펙트럼은 21개의 다음과 같은 특징적인 peak들을 보이고 있다: δ 166.3 및 164.6, piperazinedione ring의 C-1 및 C-4 amide carbonyl

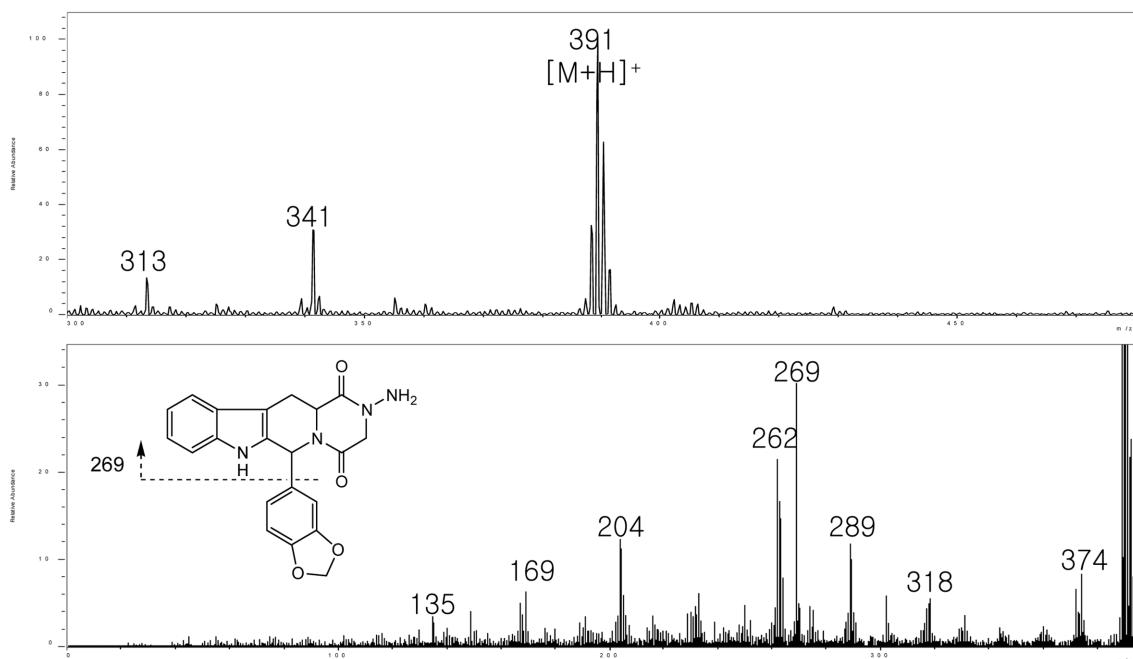


Fig. 1 – The LC/MS-ESI and fragmentation spectra of the unknown tadalafil analogue. The fragment peak at m/z 269 was assigned as indicated in the structure shown.

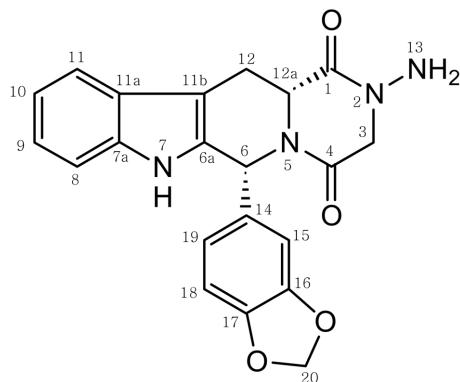


Fig. 2 – The chemical structure and numbering system of the identified tadalafil analogue, (*6R, 12aR*)-2-amino-6-benzo[1,3]dioxol-5-yl-2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-*b*]indole-1,4-dione.

carbon; δ 53.3 및 55.4, piperazinedione에서 carbonyl group과 질소로 연결되어 있는 C-3 및 C-12a carbon; δ 55.6, aromatic ring 및 질소와 연결된 C-6 carbon; δ 23.5, indole ring 옆의 C-12 carbon; δ 100.9, 3,4-methylenedioxyphenyl ring의 C-20 carbon; 기타 δ 104.8~147.0, 3,4-methylenedioxyphenyl 및 indole ring의 14 aromatic peak.

이러한 ^1H - 및 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 타다리필과 비교하였는데, 미지물질의 amino group [^1H -NMR의 δ 5.13(2H, s)]과 타다리필의 methyl group [^1H -NMR의 δ 2.93(3H, s) 및 ^{13}C -NMR의 δ 32.9]을 제외하고는 거의 유사하였다.

추출분리된 화합물의 화학구조를 최종 확인하기 위해 이 화합물을 문헌에 따라 합성하였는바,^{7,8)} 이 합성 화합물과 추출분리된 화합물의 스펙트럼이 완전히 일치하였다.

결 론

기능성식품으로 시판되고 있는 프로폴리스(밀랍) 제품에서 이전에 고지되지 않았던 화합물이 HPLC 분석법에 의해 검색되었고, 이 미지첨가물을 semipreparative HPLC에 의해 분리하였다. 이렇게 분리된 화합물의 화학구조를 UV, IR, MS, NMR 분광학적 분석법에 의해 결정하였는데, 단순히 타다리필의 methyl group^a amino group^b으로 치환된 타다리필 유도체임이 밝혀졌다. 이 화합물은 기공지된 합성법에 따라 대량 합성되어 기능성식품 및 건강보조제의 부정첨가물질을 검색하기 위한 표준시료로 사용되고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청 용역연구개발과제의 연구개발비 지원(04052식품위366)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Brock, G. B., McMahon, C. G., Chen, K. K., Costigan, T., Shen,

- W., Watkins, V., Anglin, G. and Whitaker II, S. : Efficacy and safety of tadalafil for the treatment of erectile dysfunction: results of integrated analyses. *J. Urol.* **168**, 1332 (2002).
- 2) Kloner, R. A., Hutter, A. M., Emmick, J. T., Mitchel, M. I., Denne, J. and Jackson, G. : Time course of the interaction between tadalafil and nitrates. *J. Am. Coll. Cardiol.* **42**, 1855 (2003).
- 3) 식품위생법 제6조(기준·규격이 고시되지 아니한 화학적 합성품 등의 판매 등 금지).
- 4) 장재희, 박건상, 박혜경, 구용의, 최윤주, 황인경, 김대병 : 식품 중 불법 함유된 발기부전치료제 성분 검출을 위한 동시분석법 연구. *한국식품위생안전성학회지* **18**, 195 (2003).
- 5) Graz, S. R., Flurer, C. L. and Wolnik, K. A. : 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 (2004).
- 6) 식품 중 부정유해물질분석 매뉴얼 (행정간행물등록번호 11-1470000-00839-14), 식품의약품안전청 (2005).
- 7) Laboratoires Glaxo S. A., France, Tetracyclic Derivatives, Process of Preparation and Use, WO 95/19978 (July 27, 1995).
- 8) Lilly Icos LLC, Chemical Compounds, WO 02/00656 A2 (Jan. 3, 2002).