

고성능 박층 크로마토그래프를 이용한 실데나필과 그 유사 물질의 정량에 관한 연구

최현철 · 강신정 · 윤미옥 · 박상애 · 김호정 · 위세승 · 김자연 · 차기원*
식품의약품안전청 의약품평가부, 인하대학교 화학과
(2002. 11. 11 접수, 2003. 1. 17 승인)

Determination of Sildenafil and Its Related Substances Using High Performance Thin Layer Chromatography

Hyun-Cheol Choi, Sin-Jung Kang, Mi-Ok Yun, Sang-Aeh Park, Ho-Jeong Kim, Sae-Seung We, Ja-Yeon Kim,
Ki-Won Cha*

Drug Evaluation in Korea Food & Drug Administration

**Department of chemistry, Inha university*

(Received Nov. 11, 2002, Accepted Jan. 17, 2003)

요 약 : 고성능박층크로마토그래프 (HPTLC : high performance thin layer chromatography)를 이용하여 실데나필과 그 유사체인 바데나필, 호모실데나필, 타다나필등을 신속하고 정확하게 분리정량하는 방법을 연구하였다. 실데나필 및 유사실데나필에 대한 최적의 분리조건과 각 성분의 고유한 UV스펙트럼을 얻었다. 각 성분의 검정선의 직선범위는 4성분에 대하여 약 1.0~56.5 $\mu\text{g/mL}$ 이며, 상관계수 (r^2)은 모두 0.999이상 이었다. 정량한계는 약 1.0~2.3 $\mu\text{g/mL}$, 검출한계는 약 0.8~1.8 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 정밀성을 시험한 결과 분산계수 (C.V.)가 2.5% 이하였다. 동 시험법으로 건강보조식품중 함유되어 있는 실데나필 및 그 유사체의 확인 및 함유량을 매우 신속하게 측정할 수 있었다.

Abstract : The rapid and sensitive determination method of sildenafil and its related compounds (Vardenafil, Homosildenafil, Tadalafil.) has been investigated using high performance thin layer chromatography (HPTLC). Optimizing separation conditions and simultaneous determination method of these compounds were studied. The calibration curves of those compounds at 254 nm were found to be linear in the range of 1.0 ~ 56.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The detection limits (LOD) and quantification limits (LOQ) of these were found to be 0.8 ~ 1.8 $\mu\text{g/mL}$ and 1.0 ~ 2.3 $\mu\text{g/mL}$. The coefficient of variation (C.V.) was less than 2.5%. Finally, the present method was applied to determine sildenafil and its related substances in dietary supplement.

Key words : Sildenafil, HPTLC, Dietary supplement

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)32-860-7676 Fax : +82+(0)32-872-2520

E-mail : kwcha@inha.ac.kr

1. 서 론

발기부전 치료제로 사용되는 실데나필은 전문가의 처방에 의해 사용될수 있는 전문의약품이다. 그러나 발기부전치료에 대한 효능이 알려진 후 건강보조식품 및 유사약품의 형태로 이들이 불법 유통되는 사례가 점점 늘고 있다. 특히 최근에는 Fig. 1.과 같이 실데나필과 아주 유사한 화합물까지 식품등에 불법적으로 첨가하여 음성적으로 판매되기도 한다. 지금까지 이러한 성분들에 대한 함유여부는 주로 HPLC법에 의해 검사가 이루어지고 있는데 이 방법은장비와 시험에 소요되는 경비가 많고, 시험시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 일반적으로 TLC는 특정한 전개용매 및 발색제에 의한 확인시험용으로만 사용되어 왔으나, 정량적인 점적기

와 고성능의 검출기를 장착한 HPTLC의 보급으로 이를 이용한 생체시료 및 일반의약품중에서의 함량분석등 많은 연구들이 수행되고 있다.¹⁻⁵⁾ HPTLC는 TLC법과 마찬가지로 혼합성분의 분리메카니즘은 동일하나 He가스를 이용한 스프레이 방식의 띠 또는 원형으로 정밀하게 점적할수 있는 점적기를 부착하였으며, UV반사에 의한 검출방식으로 전과장을 스캔하거나 단일과장을 선택하고 농도에 따른 흡광도를 측정하여 분석에 이용될수 있는 분석법이다. 지금까지 실데나필의 경우 LC/MS를 이용한 생체시료에서의 확인시험, HPLC법을 이용한 의약품에서의 함량시험등에 관하여 이미 많은 연구가 진행 되어왔다.⁶⁻¹⁰⁾ 본 연구에서는 실데나필과 그 유사체들에 대하여 HPTLC법으로 신속하게 동시에 분리·정량하는 분석법을 개발하고자 하였다.

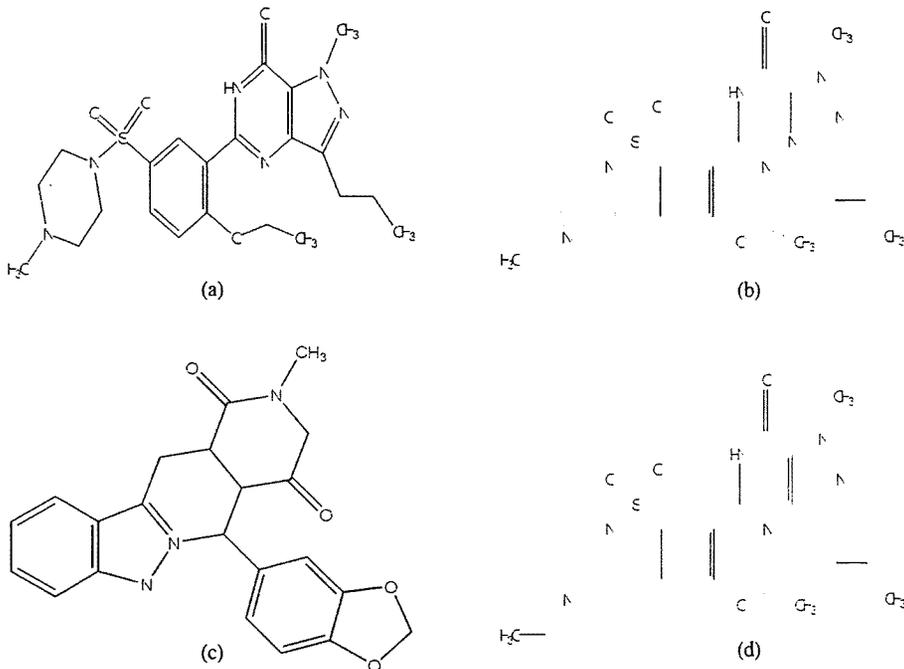


Fig. 1. Chemical structures of

- (a) sildenafil(1-[[3-(4,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-methylpiperazine)
- (b) vardenafil(2-[2-ethoxy-5-(4-ethyl-piperazine-1-sulfonyl)-phenyl-5-methyl-7-propyl]-3H-imidazo[5,1-f]-[1,2,4]triazin-4-one)
- (c) tadalafil(6-(1,3-benzodioxol-5-yl)-2,3,6,7,12,12a-hexahydro-2-methylpyrazinolo[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione)
- (d) homosildenafil(1-[[3-(4,7-dihydro-1-methyl-7-oxo-3-propyl-1H-pyrazolo[4,3-d]pyrimidin-5-yl)-4-ethoxyphenyl]sulfonyl]-4-ethylpiperazine)

2. 실험

2-1. 시약 및 기기

1) 시료 및 시약

구연산실테나필 (97.5%), 호모실테나필 (100%), 타다나필 (99.9%), 바데나필 (99.8%)의 각 표준물질은 식품의약품안전청 정량용원료 (의약품제조회사제공)를 사용하였으며, 표준용액 제조 및 이동상 제조에 사용된 시약은 HPLC급 메탄올 및 탈이온수를 사용하였다. TLC판은 HPTLC용 Plate (CAMAG, 10 X 10 cm)로 고밀도 판을 사용하였다.

2) 기기

TLC판은 Precoated 50 HPTLC plates silicagel 60 F₂₅₄ (Merck), 점적은 ATS4 (CAMAG)의 스프레이방식 노즐을 사용하였고, 전개는 Camag Twin-trough chamber (for 10 cm × 10 cm plates)에서 하였으며, Densitometric scanner는 Camag TLC Scanner III로 검출파장 200~400 nm에서 absorbance-reflectance mode로 스캔하여 측정하였다. 스캐너는 bandwidth 6 nm, slit width 4.0×0.45 μm, scanning speed 20 mm/s이다. 계산프로그램은 winCATS version 1.1.3.0 (CAMAG)으로 하였다.

2-2. 실험방법

1) 표준용액 제조

구연산실테나필 17.6 mg, 호모실테나필 19.6 mg, 타다나필 22.6 mg 및 바데나필 10.4 mg을 각각 취하여 100 mL 용량플라스크에 넣고 메탄올로 녹인후 100 mL로 묽혀 저장용액을 제조한 후 적당한 양을 취하여 혼합하여 최종농도가 실테나필 44.05 μg/mL, 호모실테나필 49.04 μg/mL, 타다나필 56.52 μg/mL 및 바데나필 26.08 μg/mL가 되도록 혼합표준액을 만들어 사용하였다.

2) 전개용매의 종류 및 TLC 판의 영향

전개용매를 Table 1과 같이 제조하여 여러 가지 HPTLC에서 각 성분의 최적 분리조건을 나타내는 전개용매 조건과 분리능이 우수한 TLC판을 선택하였다.

3) 검정선의 작성 및 직선성

일반적으로 TLC법에서는 검정선을 작성할 때 점적하는 양 (μg)에 대하여 봉우리면적으로 검량선을 작성한다. 즉, 동일한 농도의 시료를 가지고 점적하는

부피를 달리하여 검량선을 그렸다. 그러나 이는 점적되는 양에 따른 편차 및 점적부위의 퍼짐정도 등에 따라 재현성의 편차가 날수 있다. 따라서 본 연구에서는 동일한 부피의 스프레이 방식으로 점적하여 이러한 단점을 없애고자 하였다. 혼합표준액을 메탄올로 적당한 농도로 희석하여 전개한후 각 성분의 봉우리 면적을 254 nm에서 측정하여 검량선을 작성하여, 각 성분에 대한 직선범위와 직선성을 구하였다.

4) 검출한계 및 정량한계

혼합표준액을 메탄올로 여러 농도로 희석하여 10 μL로 일정하게 점적하여 파장 254 nm에서 각 성분의 피크면적을 계산하여 검출한계 및 정량한계를 구하였다.

Table 1. Composition of developing solvent

	Composition	Ratio
1	CHCl ₃ : CH ₃ OH : NH ₄ OH	(90/1/5)
2	EtOAc : IPA : NH ₄ OH	(90/10/5)
3	EtOAc : CH ₃ OH : NH ₄ OH	(90/10/1)
4	EtOAc : MeCN : NH ₄ OH	(90/10/5)

EtOAc : Ethylacetate, MeCN : Acetonitrile, IPA : Isopropanol
NH₄OH : 25% ammonia .

3. 결과 및 고찰

3-1. 최적분리조건

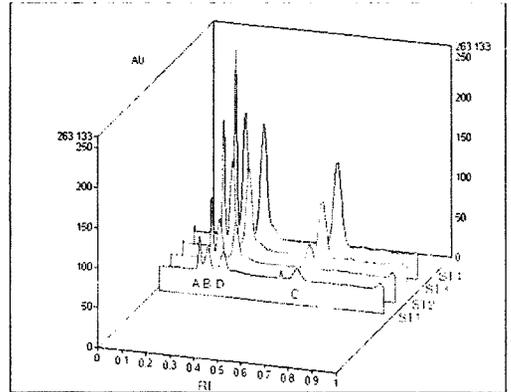
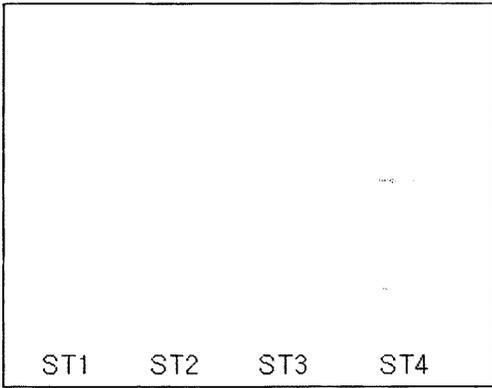
실테나필을 포함한 4성분의 표준혼합액을 가지고 여러 가지 HPTLC용 전개판과 Table 1과 같은 다양한 전개용매 조건으로 전개시킨 결과 고밀도로 코팅된 실리카의 HPTLC용 전개판에서 ethylacetate : acetonitrile : ammonia (25%)의 비가 90 : 10 : 5로 혼합한 용리액에서 가장 양호한 분리가 이루어 졌으며, 기타 전개용매에서는 실테나필 및 바데나필이 구조적으로 매우 유사하여 동 성분의 분리가 잘 이루어지지 않았다. 위 전개용매 조건에서 일반적으로 사용되고 있는 실리카판과, 고밀도로 코팅된 HPTLC용 실리카판을 비교한 결과 HPTLC 판에서 Fig. 2a와 같이 양호한 분리가 이루어 졌다. 또한 헬륨기체를 이용한 분사방식의 점적을 사용 함으로 일반 TLC판의 경우 점적부위에 실리

카판의 손상이 생겨 정밀한 시험에 영향이 미치는 것으로 나타났다.

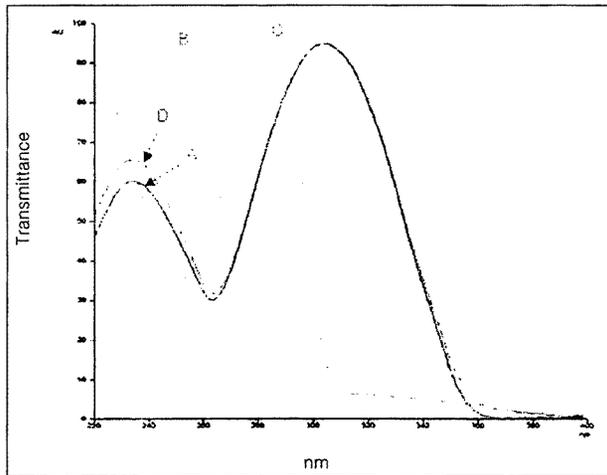
3-2. UV스펙트럼을 이용한 확인시험

분리된 각 성분의 반점들을 파장 230 nm에서 400 nm 사이를 스캔한 결과 Fig. 2b 처럼 실테나필과 호모실테나필의 경우 동일한 스펙트럼을 나타내고 있으

며, 타다라필은 실테나필의 스펙트럼보다 약간 단파장 쪽으로 이동한 것처럼 나타나고 있다. 바테나필의 UV 스펙트럼은 다른 스펙트럼과는 아주 다른 형태를 갖고 있다. 따라서 각각의 반점의 머무름인자 (R_f)와 각 반점의 성분분석은 표준물의 UV스펙트럼과 비교하여 확인 할 수 있었다.



a



b

Fig. 2. HPTLC chromatograms (a) and UV spectra (b) of sildenafil and its related substances.

A : sildenafil, B : vardenafil, C : Tadanafil, D : Homosildenafil

3-3. 검정선

위에서 얻은 최적조건에서 표준혼합액 (Fig. 2a)으로 검정선을 작성한 결과 Fig. 3과 같이 각 성분의 직선범위는 실데나필 1.8~44.1, 바데나필 1.0~26.1, 호모실데나필 2.0~49.0 및 타다나필 2.3~56.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, 이때 직선성은 각 성분 모두 0.999이상으로 매우 양호하였다.

표준혼합액을 희석하여 봉우리면적의 신호대 잡음 (S/N) 비가 3배 이상이 되는 농도를 검출한계 (LOD)로 측정하고, 검정선에서 직선성이 있는 최저농도를 정량한계 (LOQ)로 측정한 결과를 Table 2에 나타냈다. 각 시료의 LOD는 0.8 - 1.8 $\mu\text{g/mL}$ 이며 LOQ는 1.0 - 1.8 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

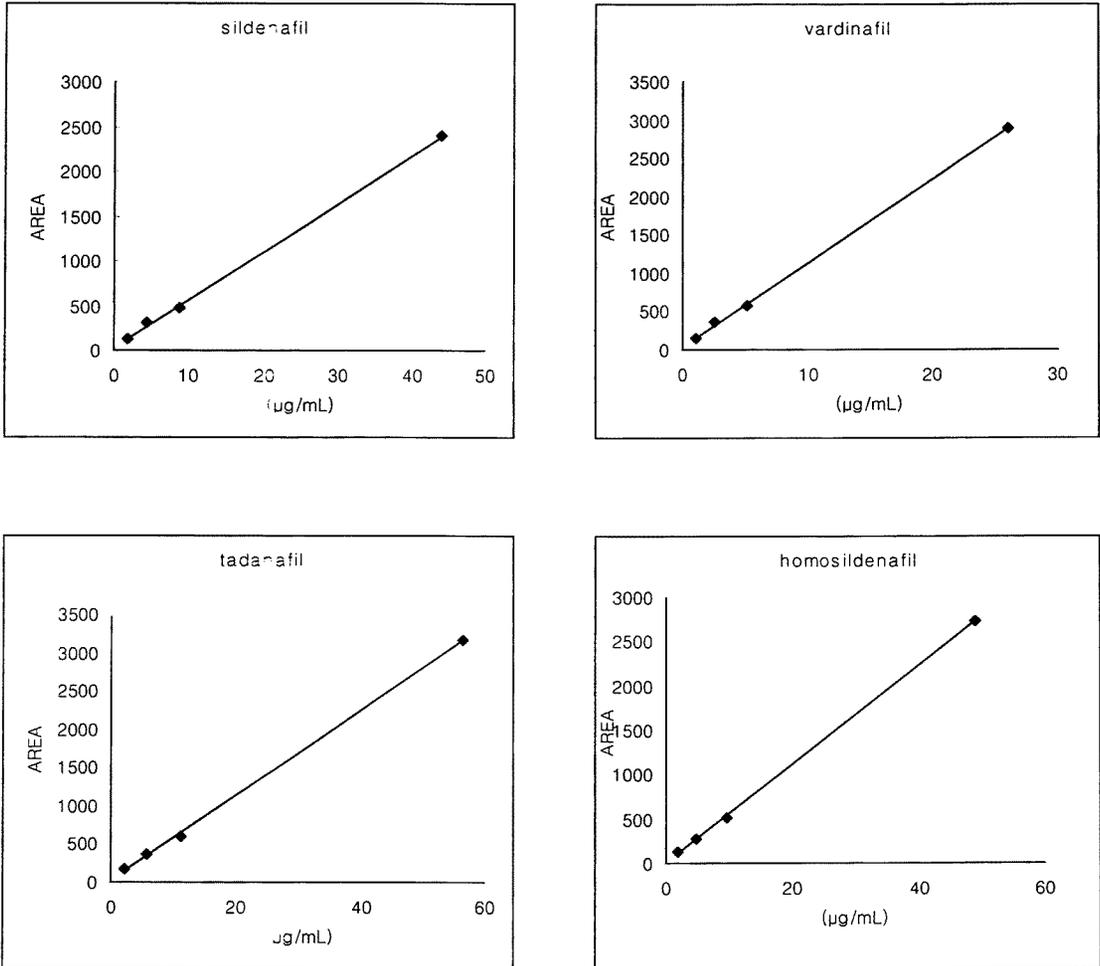


Fig. 3. Calibration curves of sildenafil and its related substances

3-4. 정밀도시험

본 분석법의 정밀도를 보기위해 농도가 다른 표준혼합액을 5회 반복 분석을 한 결과 Table 3과 같이 각 성분의 C.V.값은 모두 2.5% 이하로 정밀도를 나타냈다.

3-5. 응용

본 분석법으로 불법적으로 유통되는 건강보조식품 5개의 제품에 대하여 분석한 결과는 Table 4와 같다. Table 4를 보면 2개 제품에서 실데나필 및 타다라필이 검출 되었으며, 시료 1 (SPL 1)에는 52.9 ppm의 실데

나필이 검출 되었고, 시료4 (SPL 4)의 경우 실데나필이 2.2 ppm 검출되었다. 그리고 시료2 (SPL 2)와 3 (SPL3) 경우 19.0과 37.4 ppm의 타다나필이 검출 되었다. 이는 HPLC에서 얻은 결과와 분석오차 내에서 일치하였다. 이들 분석치는 3회 분석하여 얻은 평균치이며 상대표준편차 (RSD)는 2%미만이였다. 이와 같이 많은 양의 실데나필 및 타다나필이 함유된 제품의 경우 섭취시 인체에 큰 폐해를 끼칠수도 있을 것으로 사료된다. Fig. 4에는 이들을 분석하는데 사용했던 시료와 표준시료의 크로마토그램 일부를 나타냈다.

Table 2. LOD and LOQ of sildenafil and its related substance

	Sildenafil	Homosildenafil	Tadanafil	Vardenafil
LOD ¹⁾ (μ g/mL)	1.4	1.5	1.8	0.82
LOQ ²⁾ (μ g/mL)	1.8	2.0	2.3	1.0

1) Limit of Detection 2) Limit of Quantification

Table 3. Relative standard deviation of analytical data

compounds	Conc. (μ g/mL)	Peak area					mean	C.V. (%)
		1	2	3	4	5		
Sildenafil	44.0	1849.5	1835.7	1856.5	1811.7	1808.7	1832.4	1.2
	8.8	390.1	380.0	387.3	382.0	380.9	384.1	1.1
	4.4	169.3	169.9	167.0	161.4	172.4	168.0	2.5
Vardenafil	26.1	2190.3	2185.6	2285.7	2131.6	2203.6	2199.4	2.5
	5.2	450.2	445.9	452.6	443.4	431.8	444.8	1.8
	2.6	189.2	183.8	193.1	191.0	188.2	189.1	1.8
Homosildenafil	49.0	2457.4	2411.5	2420.2	2309.1	2425.2	2404.7	2.3
	9.8	401.5	399.8	399.0	392.3	392.3	397.0	1.1
	4.9	198.4	192.8	202.3	196.7	191.5	196.3	2.2
Tadanafil	56.5	1701.0	1669.9	1649.0	1612.1	1619.5	1650.3	2.2
	11.3	210.2	206.6	204.7	207.7	197.7	205.4	2.3
	5.6	90.2	91.9	89.6	92.9	94.4	91.8	2.1

Table 4 Determination of five samples of dietary supplement adulterated with sildenafil and its related substance (mg/g)

	SPL1	SPL2	SPL3	SPL4	SPL5
Sildenafil	52.9(51.8)*	-	-	2.2(2.4)	-
Vardenafil	-	-	-	-	-
Homosildenafil	-	-	-	-	2.1(2.3)
Tadanafil	-	19.0(18.1)	37.4(38.1)	-	-

(*)³ Results of HPLC

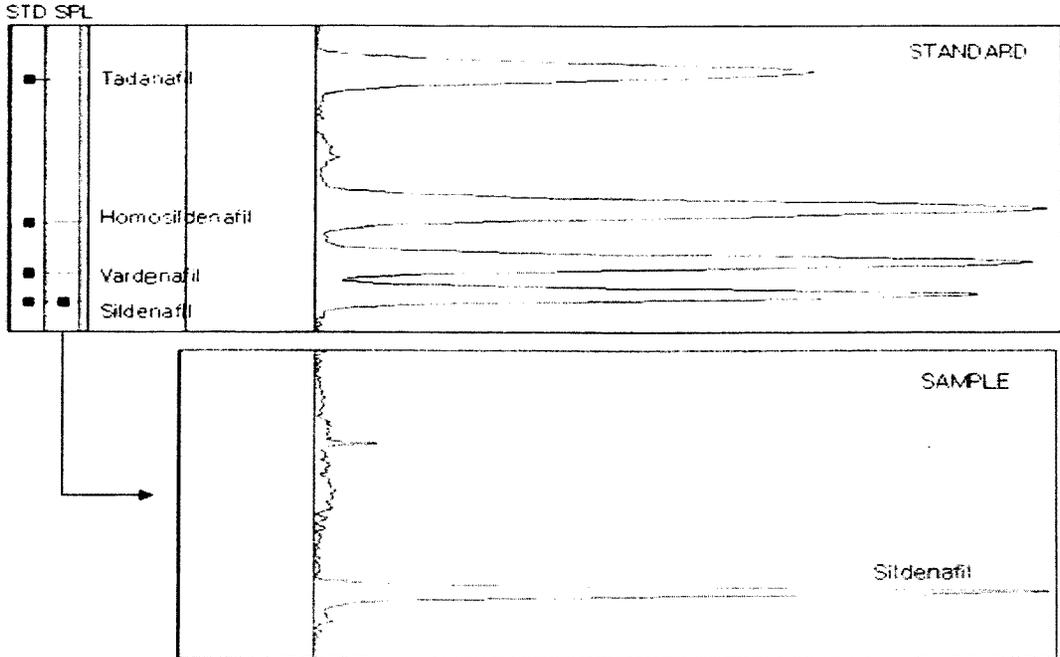


Fig. 4. Example of standard and sample chromatograms

4. 결 론

HPTLC을 이용하여 신테나필과 그의 유도체들을 신속하고 정확하게 분석하는 분석법을 연구하였다. 이 때 HPTLC용 TLC 판은 고밀도의 실리콘이 피복된 HPTLC용 판에서 4개의 유사신테나필 성분이 잘 분리되었고 이동상으로는 ethylacetate : acetonitrile : ammonia = 90 : 10 : 5인 비로 만든 이동상에서 가장 잘 분리가 이루어졌다. 이 분석법을 이용하여 시중에 유통되는 건강보조식품에서 이들을 분석하였다.

5. 참고 문헌

- 1) J. Novakovic, *J. Chromatography A*, **846**, 193-198 (1999).
- 2) L.G. Lala, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**, 539-544 (2002).
- 3) A. Shailesh, *J. Chromatography B*, **767**, 83-91 (2002).
- 4) B. Vandana, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 685-688 (2001).
- 5) S. N. Makhija, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 663-667 (2001).
- 6) A. Eerkes, T. Addison, W. Naidong, *J. Chromatography B*, **768**, 277-284 (2002).
- 7) V.D. Toulet, V. Cirimele, S. Gromb, T. Belousoff, *Forensic Science International* **126**, 71-76 (2002).
- 8) J. Liaw, T.W. Chang, *J. Chromatography B*, **765**, 161-166 (2001).
- 9) N. Daraghme, M. Al-Omari, A.A. Badwan, A.M.Y. Jaber, *J. Pharm, Biomed. Anal.*, **25**, 483-492 (2001).
- 10) M.C. Tseng, L.H. Lim, *Journal of Food and Drug Analysis (Taiwan)*, **10**, 112-119 (2002).