

LC/MS/MS를 이용한 sildenafil 및 그 유사체 분석

명승운* · 박서희 · 조현우*

한국과학기술연구원 도핑콘트롤센터

*경기대학교 이과대학 화학과

(2003. 8. 7 접수, 2003. 10. 16 승인)

Analysis of Sildenafil and its Analogues by LC/MS/MS

Seung-Woon Myung*, So-Hee Park and Hyun-Woo Cho*

*Doping Control Center, Korea Institute of Science and Technology,
P.O. Box131, Cheongryang, Seoul 136-791, Korea.*

**Department of Chemistry, KyongGi University, Suwon, Kyonggi-do, 442-760, Korea*

(Received Aug. 7, 2003, Accepted Oct. 16, 2003)

요 약 : LC/MS/MS를 이용하여 발기부전 (impotence) 치료제인 sildenafil 및 유사체인 homosildenafil, vardenafil, tadalafil을 분석하는 방법을 확립하였다. 이온화 방법으로는 electrospray ionization (ESI) 와 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) 방법을 사용하였으며 최대 감도와 재현성을 나타내는 조건을 찾기 위하여 여러 가지 파라미터를 변화시켜서 비교하였다. MRM (multiple reaction monitoring)을 위한 적절한 생성이온 (product ion)을 얻기 위하여 ESI 방법에서는 capillary voltage, cone voltage, extractor, entrance, RF lens를 변화시켰으나 전구이온 (precursor ion)을 제외한 뚜렷한 토막이온 (fragment ion)은 생성되지 않았다. 한편, APCI 방법의 경우 entrance, collision energy, exit, corona voltage, cone voltage, extractor, RF lens, cone gas, desolvation gas를 변화시켰을 때 다른 파라미터들의 변화에 따른 전구이온을 제외한 product ion 생성 패턴의 변화는 감지되지 않고 단지 RF lens 조건의 변화에서 precursor ion을 비롯한 토막이온들의 생성과 더불어 S/N의 증가로 인한 검출 한계의 향상이 나타났다. HPLC에서의 최적 분리 조건과 질량 분석기에서 최대 감도를 나타내는 이동상 조건도 조사되었는데 10 mM ammonium formate (pH 4.8):acetonitrile=70:30의 등용매 용리조건이 좋은 감도를 나타내었으며, 최적의 방법인 ESI-MRM 방법에서 검출한계 (S/N>5)는 sildenafil은 0.10 $\mu\text{g/mL}$, homosildenafil은 0.025 $\mu\text{g/mL}$, vardenafil은 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 tadalafil은 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

Abstract : By LC/MS/MS, the analytical method of sildenafil and its analogues (homosildenafil, vardenafil and tadalafil) used as used medical treatment of impotence was established. electrospray ionization (ESI) and atmospheric pressure chemical ionization (APCI) as a ionization method were

★ Corresponding author

Phone : +82+(0)2-958-5104 Fax : +82+(0)2-958-5059

E-mail : swmyung@kist.re.kr

applied. Several parameter were varied and the sensitivity and reproducibility were compared. In LC/ESI-MS method, capillary voltage, cone voltage, extractor, entrance and RF lens to create appropriate product ions for multiple reaction monitoring (MRM) were variable parameter, but the formation of the other product ions except the precursor ion could not detect. And the value of entrance, collision energy, exit, corona voltage, cone voltage, extractor, RF lens, cone gas, and desolvation gas in APCI mode were varied, only the creation pattern of fragment ions by the change of RF lens value were detected, and the limit of detection was decreased due to the increase of S/N. Ten millimole ammonium formate (pH 4.8):acetonitrile=70:30 by isocratic elution in HPLC system was shown the maximum sensitivity in MS, the detection limit of sildenafil, homosildenafil, vardenafil and tadalafil obtained by ESI-MRM were 0.10, 0.025, 0.025, and 0.25 $\mu\text{g/mL}$ at S/N>5, respectively.

Key words : sildenafil, homosildenafil, vardenafil, tadalafil, LC/MS/MS, MRM

1. 서 론

Sildenafil은 처음에 협심증 (angina pectoris) 치료제로서 개발되었으나 임상실험 결과 큰 효과가 없었고 단지 많은 환자에서 부작용으로 발기 (erection) 현상이 보고되었으며 이를 계기로 연구자들이 sildenafil을 발기부전 치료제로 연구하기 시작하였다. Sildenafil은 cGMP-specific PDE5¹ (cyclic guanosine monophosphate-specific phosphodiesterase type5)의 억제제로서, 발기부전 치료제로 98년 3월에 미국 식품의약청 (Food and Drug Administration)의 승인을 받았으며 미국 파이저 (Pfizer)사에서 판매하는 상품명인 비아그라 (Viagra)로 많이 알려져 있다.

Sildenafil을 분석하기 위한 방법으로 HPLC/UV^{2,5}와 LC/MS^{8,9} 검출법이 보고되었으며, 생체시료에서 sildenafil과 그의 대사체 UK-103,320의 동시 분석을 위해 LC/MS/MS^{9,10} 검출법을 이용한 분석법이 보고되고 있다. 한편, John¹¹ 등은 LC/MS/MS 검출법에서 MRM (multiple reaction monitoring)을 이용하여 사람의 혈청에서 sildenafil과 대사체인 UK-103,320을 동시에 분석하였으며 분석한 결과에서 sildenafil의 정량한계가 2 ng/mL 이었다고 보고하였다. 그리고 Angela¹² 등 역시 LC/MS/MS 검출법에서 MRM을 이용하여 sildenafil과 대사체인 desmethylsildenafil을 동시에 분석하였으며 그 결과 혈액에서 정량한계가 1ng/mL이며 LC/MS/MS 검출법이 sildenafil과 대사체인 desmethylsildenafil을 측정하는데 적합하다고 보고하였다. 이밖에 GC/MS⁶와 micellar electrokinetic chromatography⁷ 등을 이용한 분석 방법들이 보고되었다.

최근 남성용 성기능 장애 치료제인 비아그라 (Viagra)

의 대체 치료제로서 미국 FDA의 승인을 받은 바이엘사의 바데나필 (vardenafil)이 있으며, 릴리 (Lilly)사의 시아리스 (상품명: Cialis, 성분명: tadalafil)는 곧 승인 판매가 승인될 예정이다. Vardenafil과 tadalafil은 약물 복용에 대한 영향,¹³ 시간 경과에 따른 약물의 효과¹⁴에 대한 보고는 되어 있으나 대사체의 확인이나 정량 관계에 대한 결과는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 LC/MS-ESI (전기 분무 이온화)방법과 LC/MS-APCI (대기압 화학 이온화)방법의 두 가지 이온화 방식을 사용한 LC/MS/MS 기법을 사용하여 sildenafil, homosildenafil, vardenafil 그리고 tadalafil을 신속하게 낮은 농도까지 분석할 수 있는 조건을 확립하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시약 및 기기

본 연구에서 사용한 표준물질인 sildenafil (69.4%), homosildenafil, vardenafil (99.8%), tadalafil (99.9%)은 식품의약품안전청에서 공급받았으며 시료를 여과하기 위하여 0.2 μm ×13 mm PTFE syringe filter (Whatman, UK)를 사용하였다. 이동상 용매로 사용된 물과 아세트니트릴은 J. T. Baker (HPLC grade, USA)에서 구입하였으며 완충용액에 사용되는 ammonium formate (99.995+%)는 Aldrich사 (Missouri, USA), formic acid (99%)는 Sigma사 (Missouri, USA)에서 구입하였다.

Agilent HP 1100 series liquid chromatograph/Micromass QuattroTM mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK)

를 사용하였으며 질량 분석기의 이온화 방식은 전기 분무 이온화 (electrospray ionization, ESI)법과 대기압 화학 이온화 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)법을 사용하였으며, 역상 HPLC system으로 화합물들을 분리하였다. HPLC 분석 조건에 사용된 컬럼은 YMC사 (Kyoto, Japan) C₁₈ 컬럼이며 ESI에서는 15 cm (length)×2.0 mm (i.d.)×5 μm (particle size)를 사용하였으며, APCI에서는 15 cm (length)×4.6 mm (i.d.)×5 μm (particle size)를 사용하였고 용매는 APCI와 ESI 방법 모두 아세트니트릴 (용매 A)과 10 mM ammonium formate 용액 (pH 4.8) (용매 B)을 사용하여 70 (A) : 30 (B)의 비율로 등용매 용리 조건으로 30분동안에 분리하였으며 운반유량은 APCI 방법에서는 1 mL/min이었으며 ESI 방법에서는 0.2 mL/min이었다.

2.2. 표준 용액의 제조

순수한 표준 물질 즉 sildenafil, homosildenafil, vardenafil 그리고 tadalafil을 메탄올을 용매로 사용하여 1000 μg/mL의 표준 원액이 되도록 표준 용액을 제조하였다. 실제 분석을 위해서는 이 표준 용액을 1차 표준 물질로 사용하였으며, 메탄올을 사용하여 희석함으로써 20 μg/mL가 되도록 작업 표준 용액을 조제하였다. 작업 표준 용액은 분석에 앞서서 0.2 μm×13 mm PTFE syringe filter (Whatman, UK)를 사용하여 여과한 후 사용되었다.

2.3. 질량 분석기의 조건

ESI법에서, cone gas와 desolvation gas로는 액체질소를 사용하였고 각각 45 L/hr, 550 L/hr의 유량으로 흘러주었으며, source 온도와 desolvation 온도는 120 °C와 200 °C였다. 최대 감도와 최적의 product ion 생성 조건을 찾기 위하여 capillary voltage는 1-4 kV, cone voltage는 15-75 V, collision energy는 50-90 eV, RF lens는 0-4 V까지 변화시켰다.

대기압 화학 이온화 (APCI)법에서는 corona gas와 desolvation gas로는 액체 질소를 사용하였으며 source 온도와 desolvation 온도는 120 °C와 450 °C이었다. 최적의 토막이온 생성 조건과 감도를 찾기 위하여 entrance는 -5-0 V, collision energy는 10-40 eV, exit는 0-5 V, corona는 1-7 μA, cone voltage는 15-55 V, extractor는 0-5 V, RF lens는 3-4 V, cone gas는 50-150 L/hr, desolvation gas는 200-500 L/hr까지 변화 시켜주면서 화합물들의 감도와 product ion 생성 양상을 관찰하면서 최적의 조건

을 설정하였다.

위에서의 파라미터 변화를 통해서 설정된 조건을 텐덤 질량 분석기의 작동 모드 중의 하나인 multiple reaction monitoring (MRM) 모드에 적용하여 sildenafil 및 그 유사체들의 정량을 위한 검출한계 및 검정 곡선을 구하였다.

2.4. 검정 곡선의 작성

검정 곡선을 작성하기 위한 표준 검정 용액은 다음과 같이 만들어 사용하였다. Sildenafil, homosildenafil 및 vardenafil은 메탄올 용액에 만들어진 20 μg/mL의 표준 용액을 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.5 μg/mL의 농도로 희석하여 조제하였으며, tadalafil은 100 μg/mL의 표준 용액을 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5, 10 μg/mL의 농도로 희석하여 만들어서 LC/MS/MS로 분석하였다. 각 검정 용액의 표준 물질에 대한 피크 면적과 농도와의 관계를 표시하는 외부 표준 검정 곡선을 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 역상 HPLC의 조건 확립

본 연구에서 분석한 화합물인 sildenafil, homosildenafil, vardenafil 그리고 tadalafil의 화학 구조는 Fig. 1과 같으며 tadalafil을 제외한 나머지 3종류의 화합물은 유사한 구조를 가지고 있다.

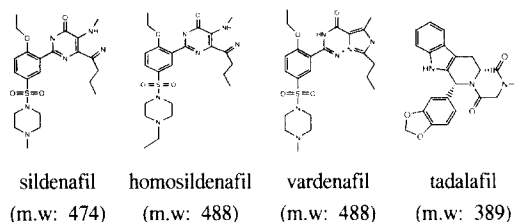


Fig. 1. Chemical structures of sildenafil, homosildenafil, vardenafil, and tadalafil.

역상 HPLC 조건에 의한 ESI 방법의 양이온 모드에서, 분리능을 향상시키기 위하여 이동상을 물과 아세트니트릴의 혼합 조성의 경우 tadalafil이 [M+H]⁺ 형태로 protonation되는 효율이 좋지 않아서 피크가 검출되지 않았다. 따라서, 수용액을 10 mM ammonium formate

(pH 4.8)로 바꾸어 사용하였다. 이때 이동상의 조성으로 용매 A는 10mM ammonium formate 용액을 사용하였고 용매 B는 아세토니트릴을 사용했으며 A:B=80:20으로 하였을 때 sildenafil, homosildenafil 그리고 vardenafil의 머무름 시간이 10분 이내로 검출되었지만, 피이크 넓어짐 현상이 심하고 tadalafil의 경우 용출 시간이 길어져 동시 분석에 적합하지 않았다. 따라서 이동상의 비율을 A:B=70:30의 등용매 용리 조건으로 하였을 때 sildenafil은 10.01분, homosildenafil은 10.83분, vardenafil은 8.34분, 그리고 tadalafil은 25.09분으로 모든 성분의 분석 시간이 30분 이내에 검출(Fig. 2)이 가능하였으므로 HPLC는 모두 이 조건을 사용하였고 이온화 방법에 따라서 단지 유량의 차이만 존재하도록 하였다.

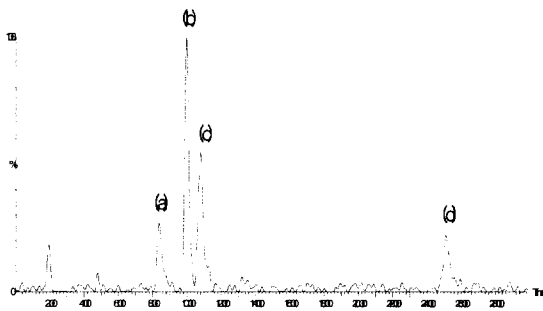


Fig. 2. Chromatogram of sildenafil and its derivatives (1 $\mu\text{g/mL}$) obtained by LC/ESI-MS MRM mode; (a) vardenafil, (b) sildenafil, (c) homosildenafil, (d) tadalafil.

3.2. MS/MS의 조건 확립

3.2.1. 대기압 화학 이온화 (APCI)법

대기 압력 이온화(atmospheric pressure ionization, API)법¹⁵은 열적으로 불안정하며 비휘발성인 화합물들의 분석에 용이하다. 또한, 토막 이온이 덜 생성되어 분자량 측정에 적합하여 MS/MS 기능이 결합되면 토막화 이온들을 통해서 분자 구조를 확인할 수 있으며 크로마토그래피(HPLC)와의 연결이 쉬운 이온화 방법으로 알려져 있다. 이 대기 압력 이온화(API)법은 APCI법과 ESI법으로 나누어진다. APCI 방법은 대기압에서 기체상 이온 분자 반응에 의해서 이온화시키는 방법으로서, 스프레이된 용매가 코로나 방전에 의해서 일차 이온을 형성한 후 분석 목표물을 이온화시키는 방법이

므로 CI(chemical ionization)와 유사한 이온화 방법이다. 이 APCI 방법은 분자량이 1,500 Da 정도의 극성이 있는 이온성 화합물을 분석하는데 적합하며 ESI 방법과는 달리 주로 1가 전하 이온을 형성한다. 또한 HPLC의 유량이 0.2~2 mL/min까지 가능하므로 일반적인 HPLC 컬럼에 용출물의 분할없이도 직접 사용할 수 있으므로 적용이 쉽다.

한편, triple quadrupole 형태의 텐덤 질량 분석기(MS/MS) 작동 모드에는 product ion spectrum, parent ion spectrum, multiple reaction monitoring, constant neutral loss spectrum 등이 있는데 본 연구에서는 product ion spectrum 모드를 이용하여 특정 이온에 대한 토막 이온을 관찰한 후 이 생성이온들을 MRM 모드 파라미터로 사용하여 분석하였다.

APCI와 ESI 방법에서, 양이온(positive ion) 모드의 일반적인 특징은 분석하고자 하는 중성 분자에 protonation되어 $[M+H]^+$ 형태로 기준 피이크가 나타나는 것이다. 본 실험에서도 APCI와 ESI 방법에서 분자량이 474인 sildenafil의 경우에 $m/z=475$ 의 $[M+H]^+$ 가 기준 피이크로 검출되었고, homosildenafil, vardenafil 그리고 tadalafil의 경우에는 $m/z=489, 489, 390$ 에서 $[M+H]^+$ 이온들이 기준 피이크(base peak)로 검출되었다.

Tadalafil은 sildenafil, homosildenafil 그리고 vardenafil과는 화학 구조 골격이 큰 차이가 난 화합물로서 product ion spectrum에서 토막이온(fragment ion)들이 잘 생성되었으며(Fig. 3) 질량 분석기의 파라미터는 Table 1에 요약하였다.

Corona 전류는 1-7 μA , cone voltage는 15-55 V, extractor는 0-5 V, entrance는 -5-0 V, collision energy는 10-40 eV, RF lens는 3-5 V, cone gas는 50-150 L/hr, desolvation gas는 200-500 L/hr까지 변화시킨 결과 RF lens변화를 제외하고는 product ion spectrum에 큰 변화가 없었으며, RF lens 변화에 대한 스펙트럼은 Fig. 4, 5, 6에 나타내었다. 그림에서 보여진 바와 같이 RF lens 값이 증가함에 따라서 생성되는 product ion들의 갯수 즉 토막이온들의 갯수와 세기가 증가됨을 볼 수 있다. 생성된 product ion을 보면 sildenafil은 $m/z = 475$ 에 대한 product ion으로 $m/z = 475, 99, 100, 283, 311$ 이 재현성있게 나타났으며, homosildenafil은 $m/z = 489$ 에 대한 product ion으로 $m/z = 489, 114, 313$ 이 재현성있게 나타났다. Vardenafil은 $m/z = 489$ 와 product ion으로 $m/z = 489, 114, 151, 169, 312$ 가 재현성있게 나타났다.

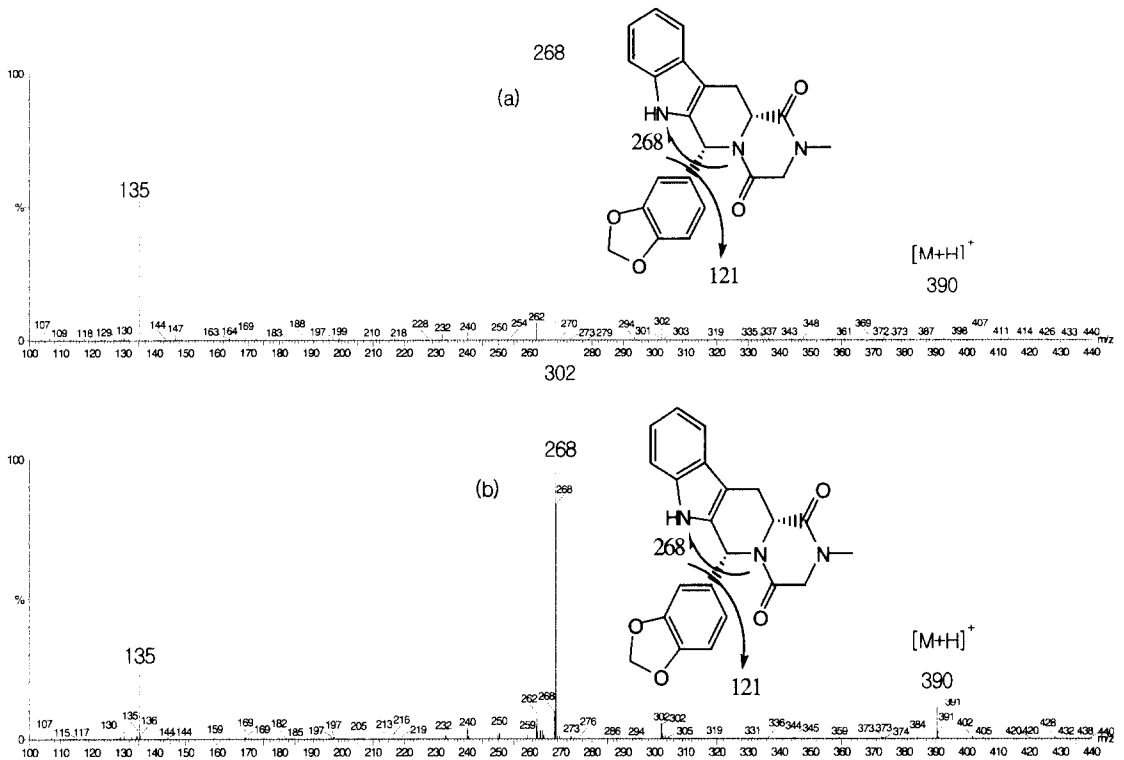


Fig. 3. Mass spectra of tadalafil by LC/MS-APCI (a) and ESI (b) in positive ion mode.

Table 1. Linear regression and correlation coefficient of standard calibration for sildenafil, homosildenafil, vardenafil and tadalafil using LC/MS-ESI

Compounds	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression eqn.	Correlation coefficient (r^2)	LOD (Limit of detection, $\mu\text{g/mL}$)	
				MRM mode	Scan mode
sildenafil	0.050 - 1.0	$y = 11131x + 70.170$	0.9998	0.100	2.50
homosildenafil	0.025 - 1.0	$y = 6642.5x + 15.939$	0.9995	0.025	1.00
vardenafil	0.025 - 0.5	$y = 3.9338x + 5.5707$	0.9999	0.025	1.00
tadalafil	0.250 - 10	$y = 2666.6x + 183.21$	0.9976	0.250	50.0

Tadalafil은 Fig. 3 (a)에서 보는 바와 같이 $m/z=390$ 의 product ion으로 $m/z = 390, 135, 268$ 이 재현성 있게 나타났다.

3.2.2. 전기 분무 이온화 (ESI)법

ESI 방법은 대기압하에서 작은 유량(1~200 $\mu\text{L/min}$)의 액체가 모세관을 통과할 때 강한 전기장(3~6 kV)

을 걸어줌으로써 원하는 화합물의 이온들이 얻어진다. ESI 방법의 특징은 거대 분자(펩티드, 단백질 등)에 대해서 다중전하된 이온들을 생성하며, 감도는 시료 전체 양보다는 농도에 의존하므로 가능하면 작은 내경의 HPLC 컬럼을 사용함으로써 유량이 낮을수록 좋다.

APCI 방법과 마찬가지로 tadalafil은 토막이온들이 잘 생성되므로 tadalafil을 제외한 sildenafil, homosildenafil 그리고 vardenafil에 대한 최적 조건을 설정하는데 목표

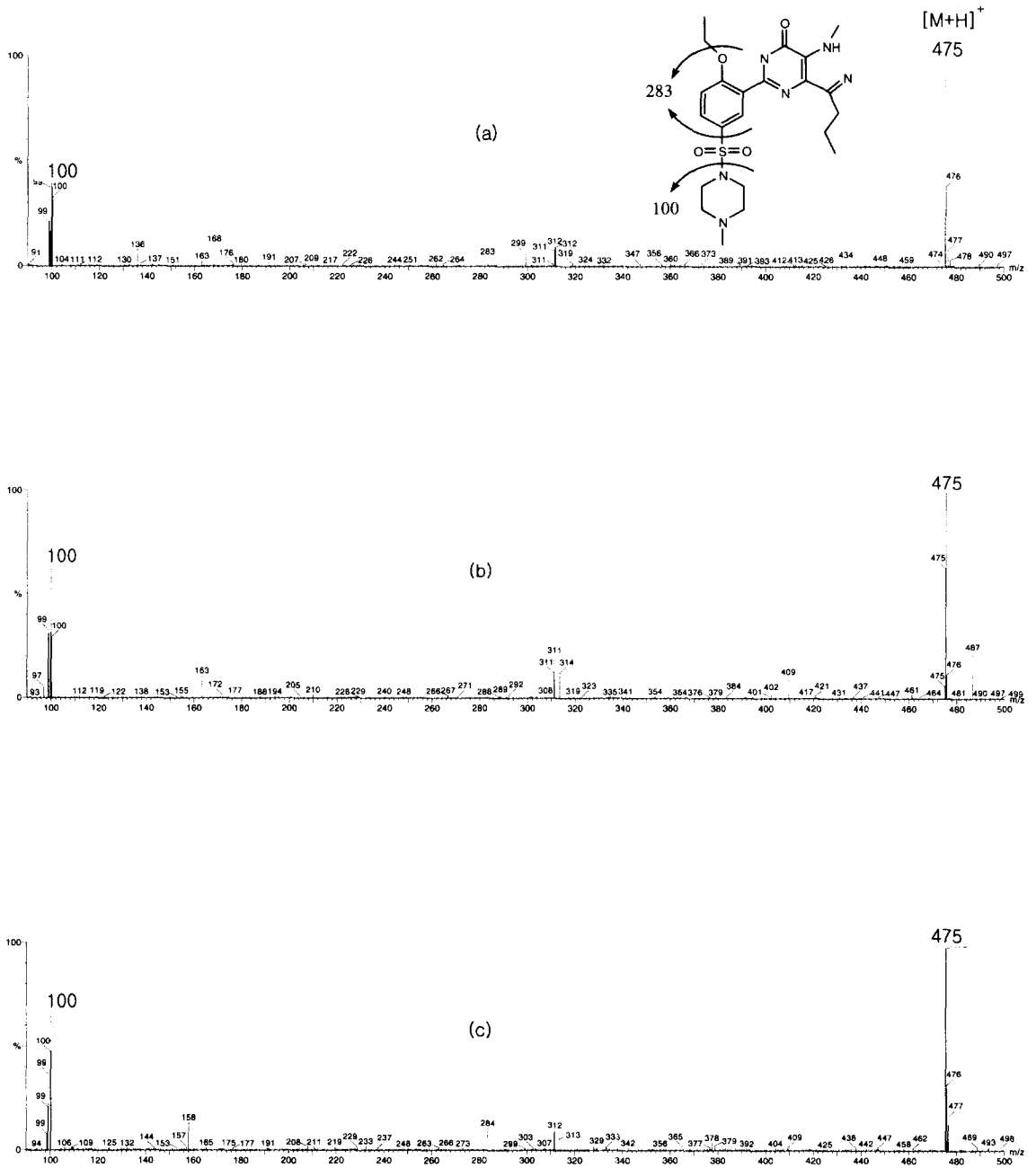


Fig. 4. Mass spectra of sildenafil obtained by LC/MS-APCI positive ion mode ; (a) RF lens = 3, (b) RF lens = 4, (c) RF lens = 5.

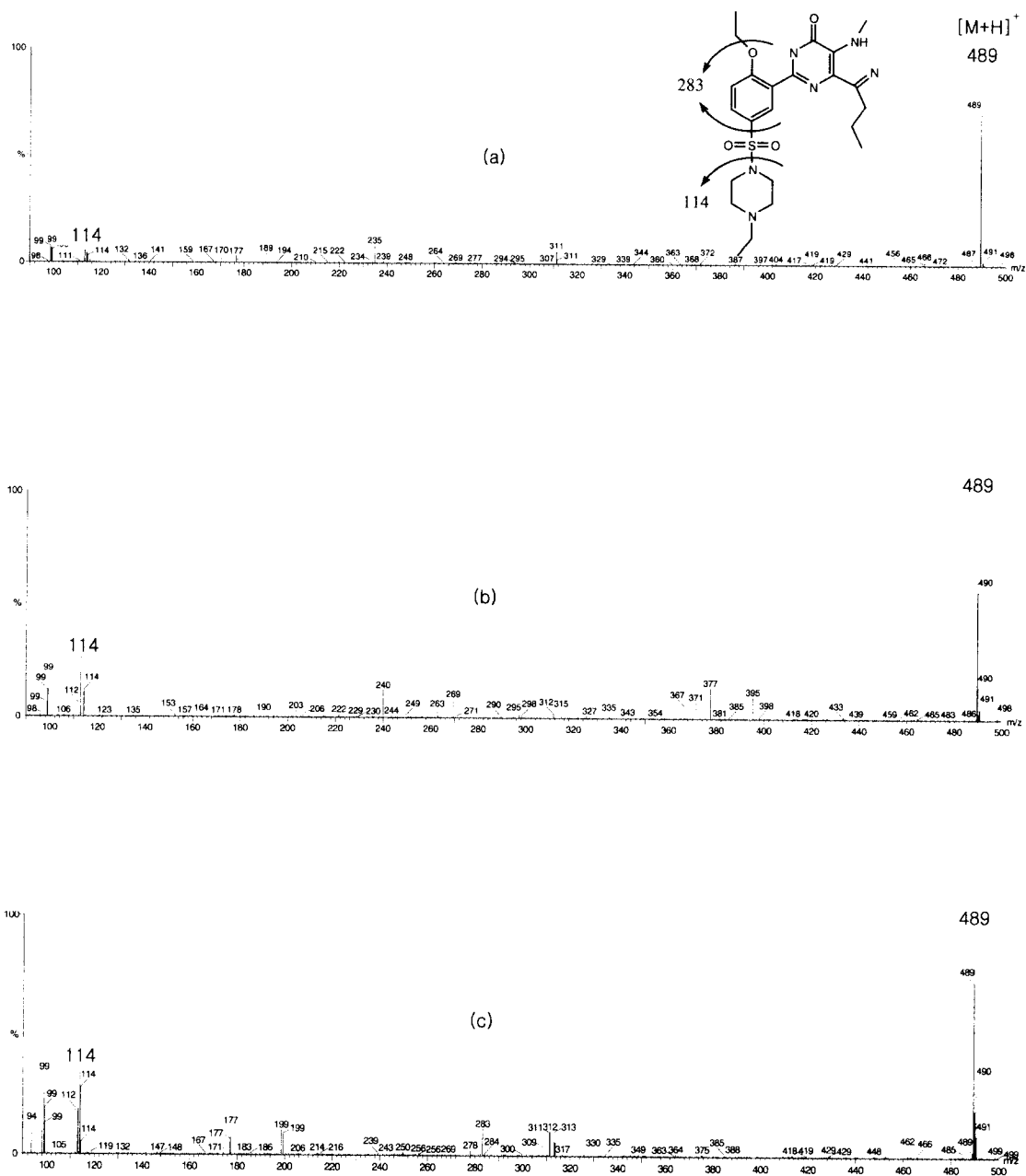


Fig. 5. Mass spectra of homosildenafil obtained by LC/MS-APCI positive ion mode ; (a) RF lens = 3, (b) RF lens = 4, (c) RF lens = 5.

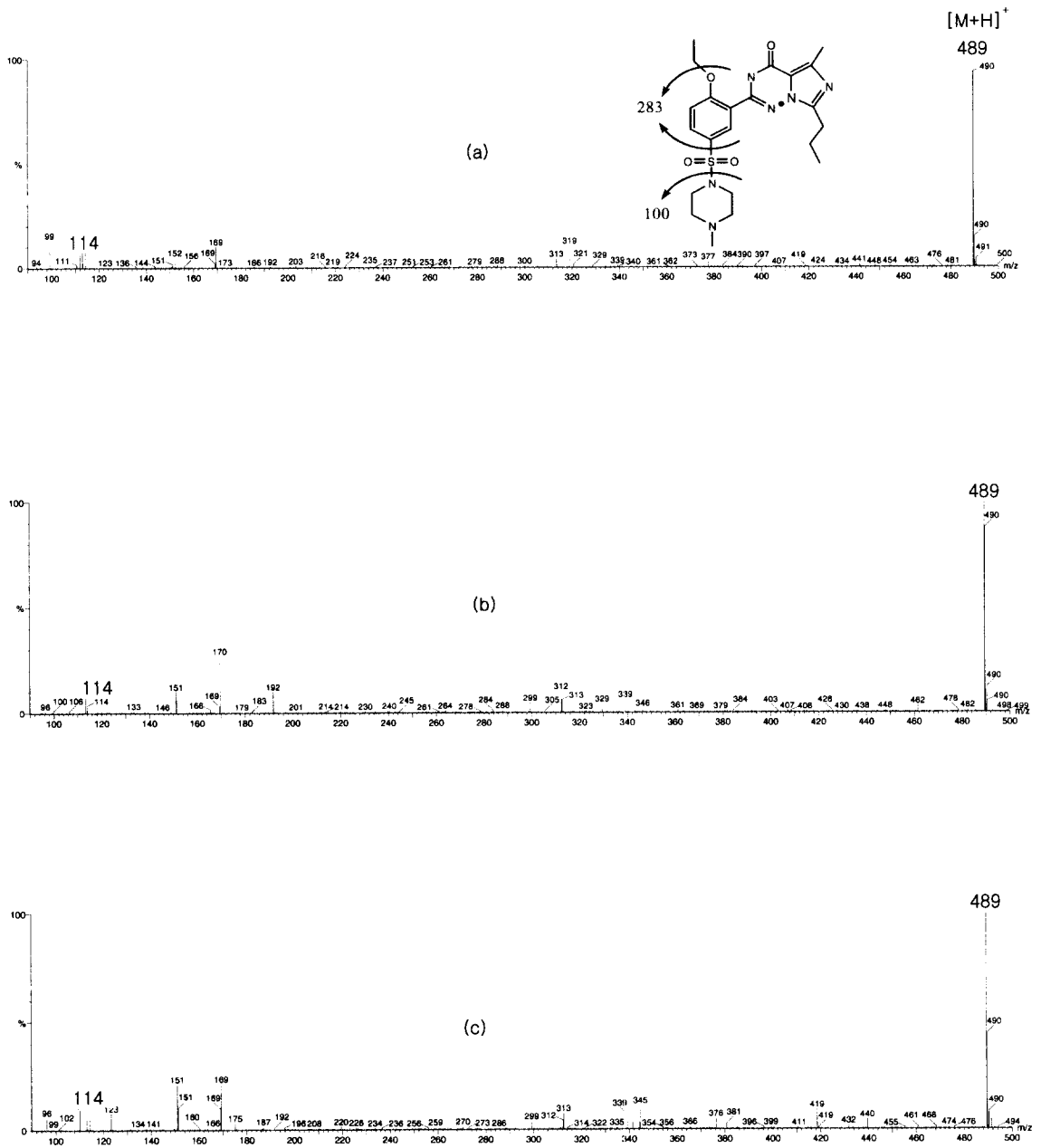


Fig. 6. Mass spectra of vardenafil obtained by LC/MS-APCI positive ion mode ; (a) RF lens = 3, (b) RF lens = 4, (c) RF lens = 5.

를 두었으며 파라미터들은 Table 2에 요약하였으며 tadalafil의 ESI 질량 스펙트럼은 Fig. 3 (b)와 같다.

Table 2. Parameters of ESI-MS to create the fragment ions

Parameter	Value
capillary voltage	1-4 kV
cone voltage	15-75 V
collision energy	50-90 eV
RF lens	0-4 V

Capillary voltage는 1-4 kV, cone voltage는 15-75 V, collision energy는 50-90 eV 범위에서 변화시켜서 관찰한 결과 ESI 방법에서는 product ion에 대한 큰 변화가 없었으며 변화에 대한 감도 변화는 Fig 7 (a), (b), (c)와 같다. APCI 방법에서와 마찬가지로 RF lens의 변화시에만 감도의 변화있음이 측정되었는데 RF lens의 증가에 따라 감도는 감소되었고 Fig. 7 (d)와 같다. 그러나 다른 파라미터에 대한 변화에서는 product ion spectrum의 변화가 거의 감지되지 않았다.

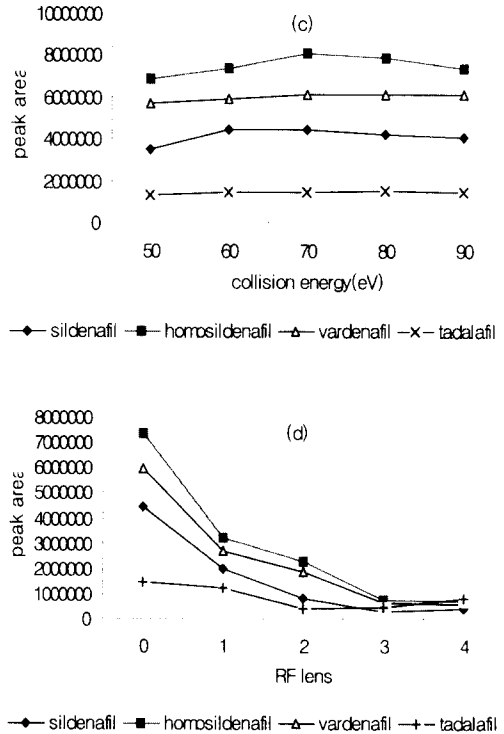
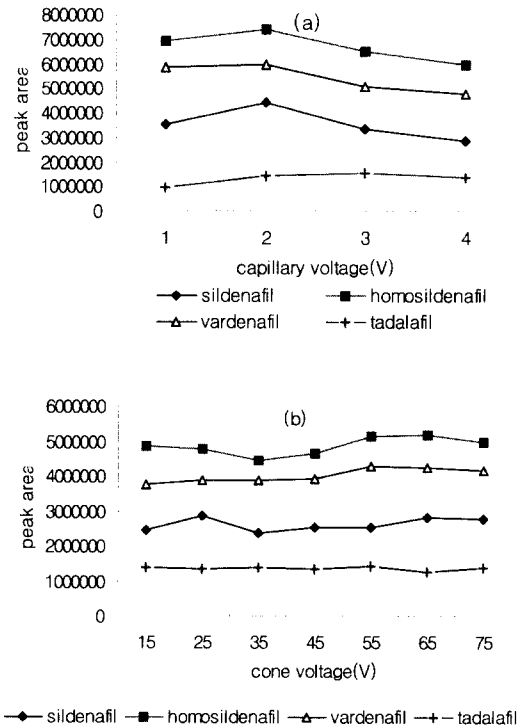


Fig. 7. Comparison between peak area according to the parameter change from a standard (20 µg/mL); (a) capillary voltage, (b) cone voltage, (c) collision energy, (d) RF lens.

Tadalafil을 제외한 나머지 3종류의 화합물은 파라미터에 따른 변화는 거의 없이 precursor ion들만이 product ion으로 생성되었다. 즉 MS/MS에서 sildenafil은 m/z = 475, homosildenafil은 m/z = 489, vardenafil은 m/z = 489, 그리고 tadalafil은 m/z = 268이 기준 피이크로 나타내었다.

3.2.3. Multiple reaction monitoring (MRM)

APCI와 ESI 방법에서 얻은 product ion들을 MRM 모드에 사용하여 정량에 응용하도록 하였다. APCI 방법에서는 sildenafil은 475->100, 475, homosildenafil은 489->114, 489, vardenafil은 489->114, 489 그리고 tadalafil은 390->135, 268을 MRM 모드의 파라미터로 설정하였다. 그 결과 APCI 방법의 경우 MRM모드에서는 20 µg/mL에서도 거의 검출되지 않았다.

Table 3. Linear regression and correlation coefficient of standard calibration for sildenafil, homosildenafil, vardenafil and tadalafil using LC/MS-ESI

Compounds	Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Regression eqn.	Correlation coefficient (r^2)	LOD (Limit of detection, $\mu\text{g/mL}$)	
				MRM mode	Scan mode
sildenafil	0.050 - 1.0	$y = 11131x + 70.170$	0.9998	0.100	2.50
homosildenafil	0.025 - 1.0	$y = 6642.5x + 15.939$	0.9995	0.025	1.00
vardenafil	0.025 - 0.5	$y = 3.9338x + 5.5707$	0.9999	0.025	1.00
tadalafil	0.250 - 10	$y = 2666.6x + 183.21$	0.9976	0.250	50.0

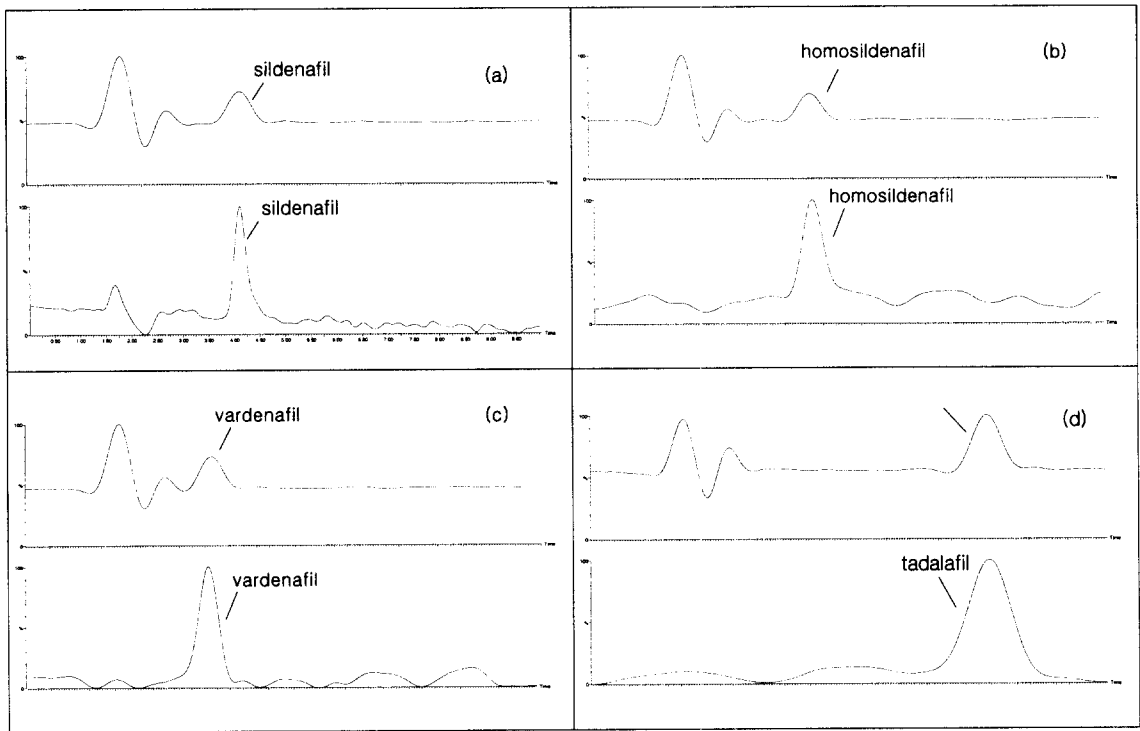


Fig. 8. Comparison of LOD between scan and MRM mode at 5<S/N

- ; (a) sildenafil ; scan mode: 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (upper), MRM mode, 0.10 $\mu\text{g/mL}$ (lower),
- (b) homosildenafil ; scan mode: 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (upper), MRM mode, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ (lower),
- (c) vardenafil ; scan mode : 1.0 $\mu\text{g/mL}$ (upper), MRM mode, 0.025 $\mu\text{g/mL}$ (lower),
- (d) tadalafil ; scan mode, 50 $\mu\text{g/mL}$ (upper), (b) MRM mode, 0.25 $\mu\text{g/mL}$ (lower).

한편, ESI 방법에서는 sildenafil은 475->475, homosildenafil은 489->489, vardenafil은 489->489 그리고 tadalafil은 390->135, 268을 MRM 모드의 파라미터로 설정하였으며 MRM 모드에서의 검출한계는 sildenafil은 0.10 $\mu\text{g/mL}$, homosildenafil은 0.025 $\mu\text{g/mL}$, vardenafil은 0.025 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 tadalafil은 0.25 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. Scan

모드의 경우 검출한계는 sildenafil은 2.5 $\mu\text{g/mL}$, homosildenafil은 1.0 $\mu\text{g/mL}$, vardenafil은 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 tadalafil은 50 $\mu\text{g/mL}$ 이었으며, MRM 모드의 검출한계와 비교한 결과는 Table 3에 요약하였다. ESI 방법에서 scan과 MRM 모드를 비교한 크로마토그램은 Fig. 8과 같으며 sildenafil 및 그 유사체의 분석에 있어서, MRM

모드를 사용하면 scan 모드에 비해 25-200배의 감도 증가를 얻을 수 있으므로 MRM 모드를 사용하도록 하였다.

3.3. 검증곡선

농도에 따른 ESI 방법의 MRM 모드를 사용한 sildenafil, homosildenafil, vardenafil 그리고 tadalafil에 대한 상관 관계식과 상관계수는 Table 3에 요약하여 나타내었다. Table 3에서와 같이 표준 물질의 농도범위 (sildenafil은 0.05-1.0 $\mu\text{g/mL}$, homosildenafil은 0.025-1.0 $\mu\text{g/mL}$, vardenafil은 0.025-0.5 $\mu\text{g/mL}$, tadalafil은 0.25-10 $\mu\text{g/mL}$)에서 sildenafil은 $r^2=0.9998$, homosildenafil은 $r^2=0.9995$, vardenafil은 $r^2=0.9999$ 그리고 tadalafil은 $r^2=0.9976$ 의 좋은 직선성을 나타내었다.

4. 결 론

LC/MS/MS를 이용한 sildenafil, homosildenafil, vardenafil 및 tadalafil 분석 조건을 확립하였다. APCI와 ESI 방법을 비교 분석한 결과 화합물의 구조를 확인하기에 유용한 fragment ion을 보기 위해서는 APCI 방법이 좋은 방법이었지만 검출한계가 높아서 정량 분석에는 적합하지 않았다. Product ion spectrum에서 precursor ion을 제외한 다른 product ion들을 생성하지는 않았지만 감도가 좋고 직선성이 좋은 모드는 ESI 방법이었고 이는 정량 분석에 적합한 방법임을 알 수 있었다. 이 연구에서 확립된 방법은 sildenafil 및 유사체들의 확인 및 정량과 가짜 발기부전 치료제의 검출에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

참고 문헌

- Graham N. MAw, Charlotte M. N. Allerton, Eugene Gbektor, William A. Million, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **13**, 1425-1428(2003).
- R. Hyland, E. G. H. Roe, B. C Jones, D. A. Smith, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **51**, 239-248(2000).
- J. D. H. Cooper, D. C. Muirhead, J. E. Taylor, R. T. Baker, *J. Chromatogr. B*, **701**, 87-95(1997).
- C. K. Jeong, H. Y. Lee, M. S. Jang, W. B. Kim, H. S. Lee, *J. Chromatogr. B*, **752**, 141-147(2001).
- J. Law, T. W. Chang, *J. Chromatogr. B*, **765**, 161-166(2001).
- K. Saisho, K. S. Scott, S. Morimoto, Y. Nakahara, *Biol. Pharm. Bull.*, **24**, 1384-1388(2001).
- J. J. B. Nevado, J. R. Flores, G. C. Penalvo, N. R. Farinas, *J. Chromatogr. A*, **953**, 279-286(2002).
- W. Weinmann, M. Bohnert, A. Wiedemann, M. Renz, N. Lehmann, S. Pollak, *Int. J. Legal Med.*, **114**, 252-258(2001)
- V. Dumestre-Toulet, V. Cifimele, S. Gromb, T. Beloussoff, Lavault, B. Ludes, P. Kintz, *Forensic Sci. Int.* **126**, 71-76(2002).
- A. Eerkes. T. Addison. T.A ddison, W. Naidoge, *J. Chromatogr. B* **768**, 277-284(2002).
- J. Kim, H. Y. Ji S. Kim, H. W. Lee, S.-S. Lee, D. S. Kim, M. Yoo, W. B. Kim, H. S. Lee, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **32**, 317-322(2003).
- Angela Eerkes, Tom Addison, Weng Naidong, *J. Chromatography B*, **768**, 277-284(2002).
- H. Porst, H. Padma-Nathan, F. Giuliano, G. Anglin, L. Varanese, R. Rosen, *Urology*, **62**, 121-125(2003).
- C.-S. Lin, Z.-C. Xin, G. Lin, T. F. Lue, *Urology*, **61**, 685-691(2003).
- 김택재, 명승운, 조현우, 김명수, "실용적인 기체·액체 크로마토그래피와 질량분석법", 353-367, 자유 아카데미, 2002.