

## UPLC-FLD를 이용한 국내 시판 오렌지 및 오렌지 주스 중 시네프린 및 *n*-메틸티라민 동시분석

김효진 · 광병만 · 안장혁\* · 박종수  
남양유업 중앙연구소 식품안전센터

### Simultaneous Determination of Synephrine and *N*-Methyltyramine in Orange Fruit and Juice from Korean Market by UPLC-FLD

Hyo Jin Kim, Byung-Man Kwak, Jang-Hyuk Ahn\*, and Jong-Su Park  
Food Safety Center, Research and Development Institute, Namyang Dairy Co., Ltd.

**Abstract** An accurate and sensitive analytical method was established for the simultaneous determination of synephrine and *n*-methyltyramine contents by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) with a fluorescence detector (FLD). A 70:30 (v/v) mixture of 10 mM sodium dodecyl sulfate (SDS) and acetonitrile was used as the mobile phase. The coefficient of correlation ( $r^2$ ) was 0.9999 for both synephrine and *n*-methyltyramine, and their limits of detection (LOD) were 0.02 and 0.01 mg/kg, respectively. The percentage recoveries for synephrine and *n*-methyltyramine were 96.4% and 100.9%, respectively, from bitter orange (*Citrus aurantium*) samples. The synephrine and *n*-methyltyramine contents were 38.07-118.21 mg/kg and 0.27-0.56 mg/kg, respectively, in the orange fruit samples, while they were 14.61-120.39 mg/kg and up to 3.34 mg/kg, respectively, in the tested commercial orange juice samples. The differences in synephrine and *n*-methyltyramine content between orange fruit and commercial orange juice were not significant ( $p < 0.05$ ). These results suggest that UPLC-FLD can be applied to develop an analytical method of quality control for commercial orange juice.

**Keywords:** synephrine, *n*-methyltyramine, orange juice, *Citrus aurantium*, UPLC

## 서 론

감귤류는 감귤나무아과(Aurantioidae) 중 감귤속(*Citrus*)·금감속(*Fortunella*)·탱자나무속(*Poncirus*)에 속하는 각 종 및 이들 3속에서 파생되어 온 품종의 총칭으로 유자, 레몬, 자몽, 오렌지, 탕자, 금귤, 광귤, 감귤 등이 이에 속한다(1). 이 중 광귤(*Citrus aurantium*)은 sour orange (bitter orange, seville orange)라고도 하며 원산지인 인도에서 아라비아를 거쳐 이탈리아·에스파냐 등 지중해 연안의 여러 나라에 전파되어 있고, 감귤(*Citrus unshiu*)은 우리나라 제주에서 생식용으로 재배되어 겨울철 과일도 가장 많이 소비되며 통조림 또는 과즙(果汁) 등의 가공에도 많이 이용되고 있다(2). 이러한 광귤과 감귤에 천연적으로 존재하는 것으로 알려진 시네프린(Fig. 1A)과 *n*-메틸티라민(Fig. 1B)은 과피와 과실에 모두 함유되어 있다(3).

시네프린은 1927년 독일에서 처음 합성된 이후 교감신경 흥분제, 항히스타민제, 혈압상승제 등으로 사용되어왔다(4-7). *N*-메틸티라민은 시네프린과 호르데닌의 전구체로서 *n*-메틸티라민에 hydroxyl기가 첨가되어 시네프린이, dimethyl기가 첨가되어 호르

데닌이 생성된다. 시네프린과 *n*-메틸티라민의 일반적인 함량은 그 종에 따라 다양하나 성숙한 광귤보다 미성숙한 광귤에 많이 존재하며, 과육에 비해 과피에 다량 존재하는 것으로 알려져 있다(8). 시네프린은 마약의 일종인 에페드린(ephedrine)과 화학적 구조가 매우 유사하여 체내에서 비슷한 작용을 하여 체중감소, 항산화 효과 등과 같은 긍정적 기능도 있지만 일시적 혈압상승, 메스꺼움, 구토, 심장병, 부정맥 등과 같은 부정적 기능도 나타내고 있다(2). US Food and Drug Administration (US FDA)에서는 광귤을 독성식품으로 분류하고 있으나 그로부터 추출한 오일, 껍질, 꽃, 잎은 식품첨가물로 분류하고 광귤의 오일 추출물은 generally recognized as safe (GRAS)에 등재하고 있다. 냉동 농축 오렌지 주스의 경우 광귤의 양을 5% 이내로 규정하고 있으며, national collegiate athletic association (NCAA)은 광귤에서 얻어진 시네프린과 광귤을 학생과 운동선수가 먹을 수 없는 금지항목에 포함시켰다(9).

Draquill 등(10)은 미국 캘리포니아에서 생산된 mandarin 주스 10종에 대하여 high performance liquid chromatography-diode array detector (HPLC-DAD)를 이용하여 시네프린 분석을 실시하였으며, Avula 등(11)은 감귤류 주스와 껍질 함유 잼에 대하여 HPLC-DAD를 이용하여 시네프린 및 adrenergic amine을 분석하였다. 이처럼 감귤류에 함유되어있는 adrenergic amines에 대한 연구가 국외에서 활발히 진행되고 있는 반면, 국내에서는 시네프린과 *n*-메틸티라민과 같은 천연물질 분석에 대한 연구가 미비한 실정이다.

식물추출물에서 시네프린과 *n*-메틸티라민 분석방법에 대한 보고로는 paper chromatography와 in-fared spectrophotometry, capil-

\*Corresponding author: Jang-Hyuk Ahn, Food Safety Center, Research and Development Institute, Namyang Dairy Co., Ltd., Sejong 339-914, Korea

Tel: 82-44-856-0381,

Fax: 82-44-857-7933

E-mail: ppori5470@hotmail.com

Received November 15, 2013; revised February 27, 2014;

accepted March 4, 2014

lary electrophoresis 법에 의하여 분리 및 확인(11-15)과 reversed-phase HPLC (16), column-switching LC-fluorescence detector (FLD) (17) 및 ion-pairing LC (18)를 이용한 시네프린을 분석한 연구가 보고되었다. 또한, 최근에 Wheaton과 Stewart(19)는 ion exchange chromatography 방법을 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민의 분석 연구를 보고하였다.

Ultra performance liquid chromatography (UPLC)는 HPLC보다 향상된 능력의 펌프와 충전 입자의 직경이 일반 컬럼보다 작은 칼럼을 장착하여 고압 조건에서 분석을 수행하기 때문에 분석시간의 단축뿐만 아니라 분리효율(separation efficiency), 해상도(resolution) 및 감도(sensitivity)가 크게 향상되는 장점이 있다(20). 현재 국내외에서 시네프린과 *n*-메틸티라민을 UPLC를 이용하여 분석한 논문에 대한 보고가 없었다. 또한, 본 논문에서 사용된 FLD 검출기는 이미 선행 연구에서 HPLC-FLD를 이용하여 시네프린을 분석한 논문(16)이 있으나 이는 column switching법을 이용하여 복잡한 기기분석조건이 요구되었다.

따라서 본 연구에서는 UPLC-FLD를 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민을 빠르고 정확하게 분석하기 위한 동시 분석 조건을 설정하고 그 방법의 정확성을 검증하고자 하였다. 또한 국내 시판 오렌지 및 오렌지 주스에 함유되어 있는 시네프린과 *n*-메틸티라민의 함량을 정량하여 천연유래 이상의 과도한 함량 함유 여부를 확인하여 그 안전성을 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

정량분석을 위해 사용된 ( $\pm$ )-synephrine 표준물질과 내부표준물질(internal standard)인 terbutaline (Fig. 1C)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며, *n*-methyltyramine은 ChromaDex (Santa Ana, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 실험에 사용된 물과 아세트니트릴은 HPLC grade (Burdick & Jackson, SK Chemical, Ulsan, Korea)로 구입하였으며, 0.2  $\mu$ m 멤브레인 필터(T22518, Pall Corporation, Michigan, Mexico)로 여과하여 사용하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodecyl sulfate (SDS)는 Sigma-Aldrich에서 구입하였으며, hydrochloric acid (HCl)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 시험법 유효성 검증에 사용한 certificate reference material (CRM)은 bitter orange (SRM 3258, NIST, MD, USA)를 구입하여 사용하였다. 개발된 시험법 적용을 위한 분석시료는 오렌지 및 감귤 주스 21종과 오렌지 및 감귤 5종을 사용하였으며, 26종 시료 모두 대전의 마트에서 유통 중인 것을 구입하였다. 모든 시료는 구입 후 4°C 이하에서 냉장보관 후 분석에 사용하였다.

### 실험기구 및 분석기기

본 실험에 사용된 실험기구는 일반적인 정량분석을 위해 이용되는 실험기구들이 사용되었으며, 최종적으로 추출된 용액을 필

터하기 위해 polytetrafluoroethylene filter (PTFE 0.2  $\mu$ m, Sartorius, Goettingen, Germany)를 사용하였다. 시료 추출을 위해 초음파 추출기(5510DHT, Branson, Danbury, CT, USA)를 사용하였고, 추출액의 분리를 위하여 원심분리기(SORVALL ST16R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 과실의 경우 과피와 과육으로 나누어 믹서(Mill 2900000, IKA, Staufen, Germany)로 분쇄하여 사용하였다. 성분함량 분석에 사용한 UPLC system은 fluorescence detector (FLD), sample manager, binary solvent manager로 구성된 Acquity UPLC™ (Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하였다.

### 표준용액의 조제

시네프린의 stock standard solution의 조제를 위해 표준물질 0.1 g을 volumetric flask에 계량하여 증류수 70 mL을 넣고 완전히 녹인 후 100 mL로 정용하여 1,000 mg/L으로 만들어 사용하였다. 검량선을 작성하기 위한 working standard solution의 조제를 위해 1,000 mg/L stock standard solution을 이동상(10 mM SDS buffer (pH 2.5):acetonitrile=70:30, v/v)으로 희석하여 4-400 mg/L로 조제하였다. *N*-메틸티라민 stock standard solution의 조제를 위해 표준물질 0.01 g을 volumetric flask에 계량하여 증류수 70 mL을 넣고 완전히 녹인 후 100 mL로 정용하여 100 mg/L으로 만들어 사용하였다. 검량선을 작성하기 위한 working standard solution의 조제를 위해 100 mg/L stock standard solution을 이동상으로 희석하여 1-10 mg/L으로 조제하였다. 내부표준물질인 terbutaline의 stock standard solution 조제를 위해 표준물질 0.1 g을 volumetric flask에 계량하여 증류수 70 mL을 넣고 완전히 녹인 후 100 mL로 정용하여 1,000 mg/L이 되도록 하였다. 그 후 내부표준물질 working standard solution의 조제를 위해 1,000 mg/L stock standard solution을 이동상으로 희석하여 200 mg/L이 되도록 조제하였다. 희석한 시네프린과 *n*-메틸티라민 표준용액과 내부표준물질 terbutaline 표준용액 200 mg/L을 각각 2 mL을 10 mL 시험관에 넣고 혼합하여 시네프린의 최종농도가 1-100 mg/L, *n*-메틸티라민 0.4-1.6 mg/L, terbutaline 100 mg/L이 되도록 하였다. 단, stock standard solution과 working standard solution은 실험 시마다 조제하여 사용하였다.

### 시료 전처리 방법

구입한 오렌지 및 감귤은 껍질 부분인 과피와 가식부인 과육으로 나누어 실험을 진행하였으며, 주스 시료는 오렌지 과즙 100% 및 감귤 과즙 100%로 표시된 주스를 시중에서 구입하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용한 과실 및 주스 시료는 믹서(Mill 2900000, IKA, Staufen, Germany)를 사용하여 3분간 균질하여 사용하였다. 균질화된 시료 중 약 5 g을 50 mL tube에 검체한 후 5 mL의 내부표준물질 용액(terbutaline 1,000 mg/L)을 첨가하였다. 시료액에 10 mL의 0.37% (v/v) HCl solution을 첨가한 후, 3분간 혼합하였다. 그 후 40°C에서 60분간 초음파 추출기를 이용하여 추

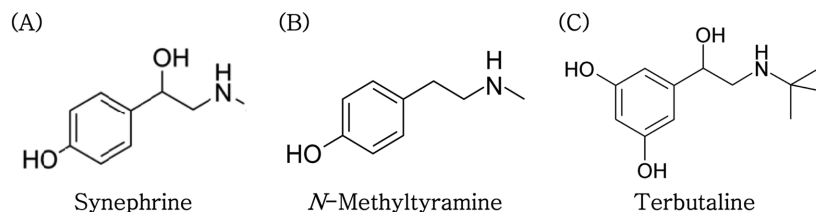


Fig. 1. Chemical structures of synephrine, *n*-methyltyramine, and terbutaline (internal standard).

출하였으며, 4,000 rpm에서 15분간 4°C에서 원심분리를 실시하였다. 상층액을 50 mL volumetric flask에 옮긴 후 남은 잔재에 15 mL의 0.37% (v/v) HCl 용액을 첨가 후 위 과정을 2회 더 반복하면서 시료를 추출하였다. 추출된 시험용액을 모두 50 mL volumetric flask에 모은 후 0.37% (v/v) HCl solution을 이용하여 50 mL로 정용하였다. 시험용액은 0.2 µm PTFE filter를 이용하여 필터한 후 기기분석에 사용하였다(Fig. 2). 실험에 사용한 과실 및 주스시료의 시네프린과 *n*-메틸티라민의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{시네프린 또는 } n\text{-메틸티라민의 함량(mg/kg)} = C \times \frac{V}{S} \times D$$

C: 검량선에서 구한 시네프린 또는 *n*-메틸티라민의 농도(µg/mL)

V: 시험용액의 최종 부피(mL)

S: 시료 채취량(g)

D: 시험용액의 희석배수

### 기기 분석조건

UPLC를 이용한 분석은 Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (1.7 µm, 2.1 × 100 mm) 컬럼을 사용 하였으며, 이동상은 물에 녹인 10 mM SDS를 인산을 이용하여 pH 2.5로 맞추는 buffer (A)와 아세토니트릴(B) 용매를 70:30 (v/v)으로 만들어 사용하였다. 이동상의 유속은 0.4 mL/min이며, 컬럼의 온도는 25°C, 총 분석시간은 15분, 시료 주입량은 1 µL 설정하였다. 파장조건은 선행연구결과(16)를 통해 여기파장(excitation, Ex) 273 nm, 기저파장(emission, Em) 304 nm으로 설정하여 peak의 면적을 측정하였다(Table 1). HPLC를 이용한 기기분석 조건은 ACE 5 RP C<sub>18</sub> ultra inert column (5 µm, 250×4.6 mm, Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland)을 분석컬럼으로, phenomenex security guard C<sub>18</sub> (AJO-4287, Madrid, CA, USA)을 가드컬럼으로 연결하여 사용하였다. 이동상의 유속은 1.0 mL/min이며, 컬럼의 온도는 25°C, 총 분석시간은 50분, 시료 주입량은 5 µL 설정하였다. 파장조건과 이동상 조건은 UPLC 조건과 동일하게 설정하여 peak의 면적을 측정하였다.

### 시험법 유효성 검증

본 연구에서 새롭게 개발된 시험법의 유효성 검증(validation)은 식품의약품안전청 의약품등 시험방법 밸리데이션 가이드라인 적용을 위한 해설서(21)에 의해 수행하였다. 시험법의 유효성 검증을 위해 선택성, 직선성, 검출한계와 정량한계, 회수율 실험을 통한 정확성 및 정밀성을 평가하였다. 유효성 검증에 관련된 실험은 모두 3반복으로 수행하였다. 시네프린과 *n*-메틸티라민 표준물질은 각각 1-100 mg/L, 0.4-1.6 mg/L의 농도에서 직선성을 평가하였으며, 각 농도별로 intensity를 측정하여 검량선을 작성

**Table 1. UPLC conditions for analysis of orange fruit and juice**

System	UPLC (Waters, Acquity™ instrument)
Column	Acquity UPLC BEH C <sub>18</sub> (1.7 µm, 2.1×100 mm)
Column temperature	25°C
Mobile phase	10 mM sodium dodecyl sulfate buffer (pH 2.5) (A) Acetonitrile (B) (A) : (B) = 70 : 30 (v/v)
Flow rate	0.4 mL/min
Detector	FLD 273 nm (Ex.), 304 nm (Em.)
Injection volume	1 µL

하였다. 직선성의 결과는 상관계수(correlation coefficient, r<sup>2</sup>)로 표현하였다.

검출한계와 정량한계를 평가하기 위해 시네프린 및 *n*-메틸티라민의 표준용액을 적정 농도로 희석하여 크로마토그램 상에서 signal to noise ratio (S/N ratio)가 3일 때의 농도를 검출한계로, 10일 때의 농도를 정량한계로 설정하였다. 일내 정확성을 측정하기 위해 하루에 3반복 실험을 하였으며, 일간 정확성을 측정하기 위해 3일간 반복 실험하였다. 정확성과 동일하게 일내 정밀성과 일간 정밀성을 측정하였으며, 결과값은 시네프린과 *n*-메틸티라민의 각각의 피크에 대한 면적의 표준편차를 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다. 회수율은 시네프린과 *n*-메틸티라민 함량이 인증된 bitter orange를 시료와 같이 전처리하여 분석한 결과로 회수율을 평가하였다.

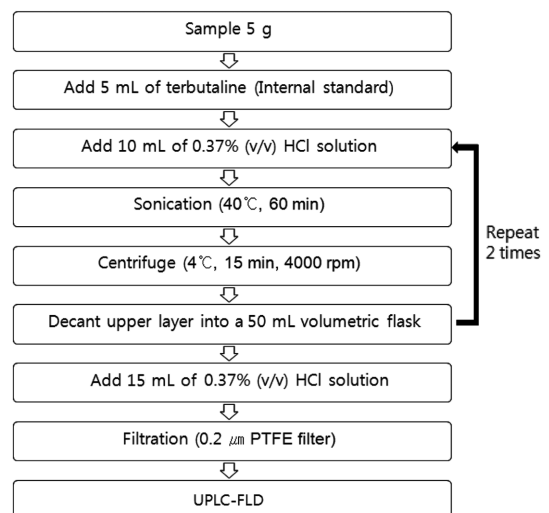
### 통계처리

모든 분석은 3회 이상 반복 수행하였고, 결과는 평균±표준편차(mean±SD)로 기술하였다. 각 실험 결과는 SPSS 프로그램 (PASW Statistics v.18, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 one-way ANOVA (*p*<0.05)로 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 시네프린 및 *n*-메틸티라민의 분석 조건 설정

시네프린 및 *n*-메틸티라민의 동시분석법을 확립하고자 다양한 용매조성 및 파장에 대하여 분석조건을 검토한 결과 새로운 분석조건을 확립하였다. 확립된 분석법을 이용하여 시네프린 및 *n*-메틸티라민과 내부표준물질인 terbutaline의 UPLC 및 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3(A-B)와 같다. UPLC로 분석 시 총 분석시간은 15분이며, 표준품을 분석하였을 때 피크의 머무름 시간은 시네프린이 4.37분, *n*-메틸티라민이 6.24분이었으며, terbutaline은 6.91분이었다. 본 연구의 분석조건에서 세부표준물질의 분리 상태는 양호하였으며, 전처리한 시료의 크로마토그램을 비교하여 시네프린과 *n*-메틸티라민의 피크가 분리되는지를 확인한 결과 Fig. 3(A)와 같이 각 성분들이 다른 피크와 간섭 없이 분리되었으며 표준용액의 피크유지시간과 오렌지 추출물의 피크유지시간이 일치하는 것을 확인할 수 있었다.



**Fig. 2. Sample preparation for the analysis of synephrine and *n*-methyltyramine.**

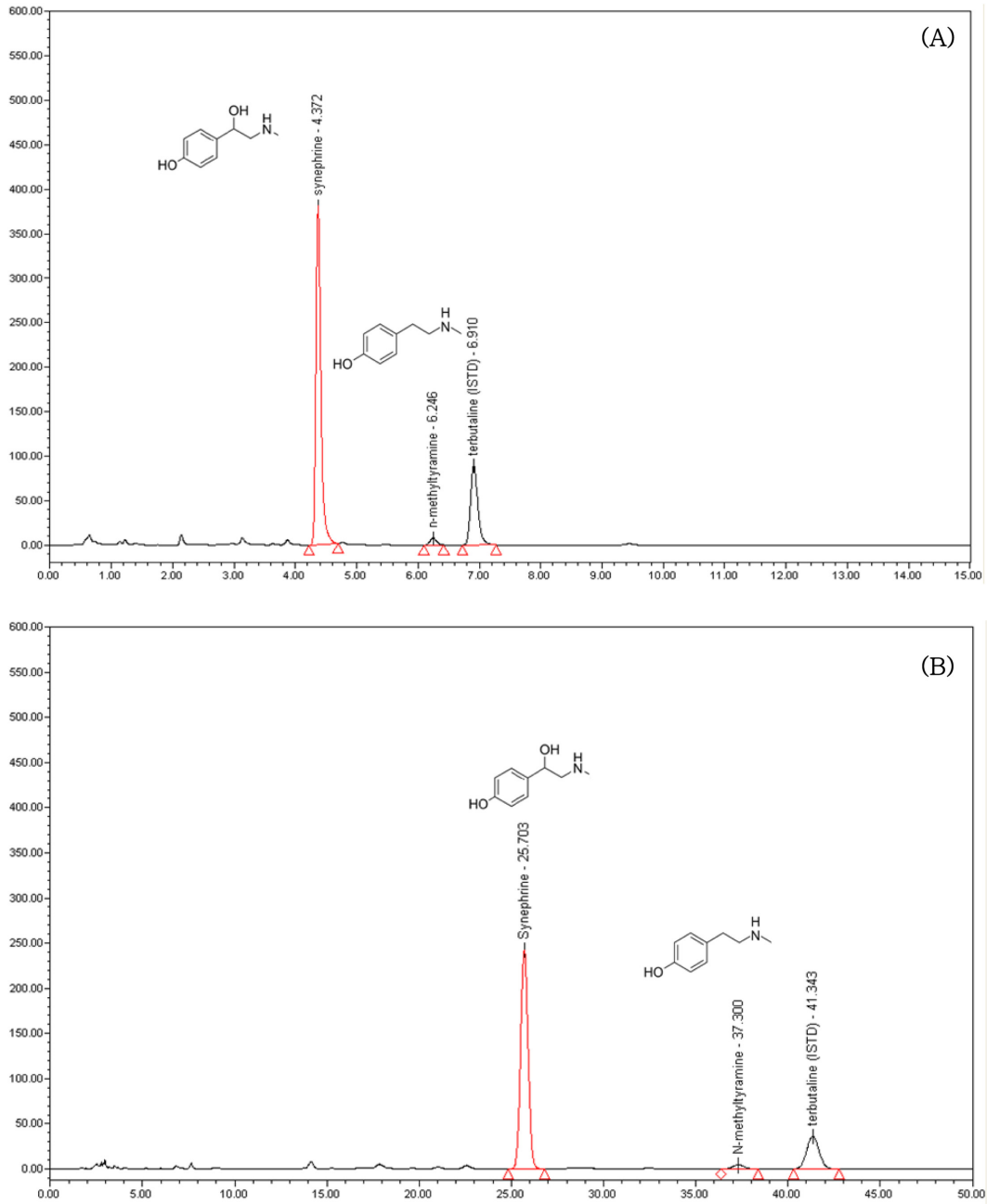


Fig. 3. Chromatograms of synephrine, *n*-methyltyramine, and terbutaline by UPLC (A) and HPLC (B).

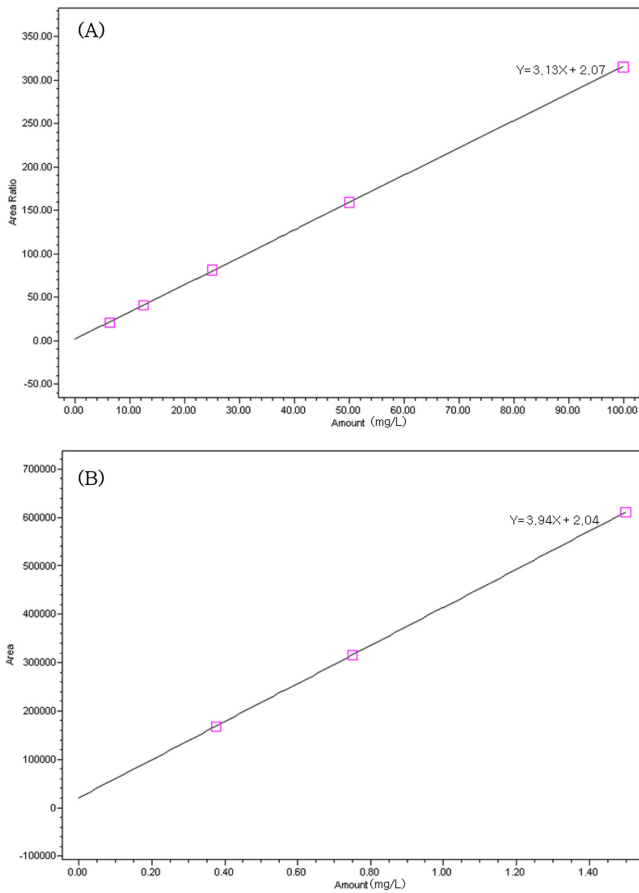
시네프린 및 *n*-메틸티라민과 내부표준물질인 terbutaline의 HPLC 크로마토그램은 Fig. 3(B)와 같다. 총 분석시간이 50분으로 각 성분들이 다른 피크와 간섭 없이 분리되었으나 분석시간이 UPLC 보다 3배 이상 소요되며 감도가 UPLC에 비해 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 기존의 HPLC를 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민을 분석한 연구들을 살펴보면 Evans와 Siitonen(22)은 30 mM sodium lauryl sulfate가 함유된 17% 아세트오니트릴과 30 mM sodium lauryl sulfate를 함유한 43% 아세트오니트릴 용매를 이용하여 구배용매조성법(gradient system)으로 시네프린과 *n*-메틸티라민의 분리 분석시간은 32분이 소요되었으며, Roman 등(23)의 연구에서는 10 mM hexanesulfonate가 함유된 borate buffer와 아세트오니트릴을 20:80 (v/v)의 조성으로 만든 용매를 이용하여 HPLC-DAD 구배용매조성법으로 과일 및 식이보충제에서 시네프린과 *n*-메틸

티라민을 분석하였다. HPLC-MS/MS로 bitter orange 함유 식이 보충제에서 시네프린을 분석한 연구에서는 pentafluorophenyl 컬럼을 이용하여 10 mM ammonium acetate 함유 buffer와 10 mM ammonium acetate 함유 methanol을 이용한 일정용매조성법(isocratic system)으로 시네프린을 분리 및 정량하였다(24).

본 연구에서 확립된 분석방법은 비교적 간단한 용매 조건인 10 mM SDS buffer (pH 2.5):아세트오니트릴 = 70:30 (v/v)을 이용하였으며, UPLC용 C<sub>18</sub> 컬럼을 이용하여 피크간의 간섭 없이 15분 내에 시네프린과 *n*-메틸티라민을 분석하였다.

**시네프린과 *n*-메틸티라민 시험법의 직선성**

직선성 검증을 위한 시네프린과 *n*-메틸티라민의 표준시료 농도 범위는 각각 1-100 mg/L, 0.4-1.6 mg/L이었으며, 농도별 표준품



**Fig. 4. Calibration curves for synephrine (A) and *n*-methyltyramine (B).**

을 만든 후 여기에 내부표준물질인 terbutaline이 100 mg/L 농도가 되도록 첨가하여 검량선용 표준시료를 만들어 UPLC와 HPLC로 분석하였다. 그 결과, UPLC에서 시네프린과 *n*-메틸티라민 모두 검량선의 상관계수( $r^2$ )는 0.9999 이상으로 두 표준품 모두 본 실험의 분석조건 하에서 높은 직선성을 나타내었다. 또한, HPLC로 두 물질을 분석하였을 때 각각 0.9995, 0.9997 이상의 높은 직선성을 나타내었다(Fig. 4).

**시네프린과 *n*-메틸티라민 시험법의 검출한계 및 정량한계**

시네프린과 *n*-메틸티라민의 검출한계 및 정량한계는 Table 2에 나타내었다. 직선성을 나타내는 범위 내에서 시네프린과 *n*-메틸티라민의 LOD값은 UPLC로 분석 시 각각 0.02 mg/L와 0.01 mg/L이며, LOQ값은 각각 0.06 mg/L과 0.04 mg/L으로 나타났다. 이는

시료에서 시네프린과 *n*-메틸티라민의 분석에 적용할 경우 각각 0.62 mg/L와 0.35 mg/L 수준까지임을 의미한다. HPLC를 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민을 분석한 결과 직선성을 나타내는 범위 내에서의 LOD값은 각각 0.04 mg/L와 0.06 mg/L이며, LOQ값은 각각 0.13 mg/L과 0.22 mg/L로 UPLC의 결과 보다 약 2-6배의 높은 값을 나타내었다. 검출한계와 정량한계를 계산하는데 이용되는 신호대잡음비는 baseline에 대한 noise와 peak의 상대비로 그 값이 낮을수록 해당 표준물질이 주어진 조건에서 잘 검출된다는 의미를 나타내므로 본 실험 결과로 미루어 보아 시네프린과 *n*-메틸티라민 분석 시 HPLC보다 UPLC에서 높은 감도를 나타내었다. 이러한 감도 차이는 UPLC가 고기능의 펌프를 사용하여 고압으로 물질을 분리하며, 컬럼 입자가 2 μm 이하의 컬럼을 사용하기 때문에 컬럼 입자가 5 μm인 HPLC 보다 3배 높은 효율성과 70% 높은 분리능을 보인다(25)는 연구결과와 일치하였다. Guillaume 등(26)의 연구결과에서 마취제인 rapidocane의 성분 분석 방법을 비교한 연구에서 UPLC법이 HPLC법에 비해 3-8배 더 빠른 분석시간과 높은 감도를 가진다고 보고와 유사하였다. 따라서 본 연구에서 확립한 UPLC 분석방법은 HPLC 분석방법 보다 시네프린과 *n*-메틸티라민 분석을 위한 높은 검출한계와 정량한계를 검증한 것으로 충분히 활용이 가능할 것으로 사료된다.

**시네프린과 *n*-메틸티라민 시험법의 회수율, 정확성 및 정밀성**

회수율, 정확성 및 정밀성 측정결과를 Table 2에 나타내었다. UPLC를 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민의 회수율을 표준인 증물질인 bitter orange를 이용하여 분석한 결과 각각 96.4%와 100.9%의 양호한 결과값을 나타내었다. 일내 및 일간 정확성 및 정밀성을 측정된 결과 시네프린과 *n*-메틸티라민의 일내 정확성은 각각 99.2%와 97.3%를 나타내었으며, 일내 정밀성은 2.46%, 2.88%로 나타났다. 일간 정확성은 각각 98.4%, 96.7%를 나타내었으며, 일간 정밀성은 3.72%, 4.74%로 일내, 일간 정확성 및 정밀성 모두 양호한 결과값을 나타냈다. 일간 정확성의 유의적인 차이를 검증하기 위해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)에 의한 검증 결과 신뢰수준 95%에서 실험결과 간에 유의적 차이가 없었다. 즉, 본 연구에서 개발된 분석방법은 유효성검증을 통하여 시네프린과 *n*-메틸티라민을 동시 분석할 수 있는 충분한 감도와 직선성 및 정확도를 갖고 있음을 확인할 수 있었다.

**오렌지 및 감귤 중 함량 분석**

본 연구에서는 대전 시내에서 구입한 오렌지 3종과 감귤 2종을 과육과 과피로 나누어 분석하였으며 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 오렌지 및 감귤을 과육과 과피로 나누어 실험한 결과 시네프린의 함량은 오렌지의 과피에서 334.18-380.98 mg/kg, 과육에서 38.07-47.09 mg/kg으로 분석되었으며, 감귤의 과피와 과

**Table 2. Recovery, accuracy, precision, detective and quantitative limits of synephrine and *n*-methyltyramine by UPLC and HPLC**

Analytes	Recovery (%)	Concentration (mg/L)	Intraday (n=3)		Interday (3 days)		LOD <sup>1)</sup> (mg/L)	LOQ <sup>2)</sup> (mg/L)	Coefficient correlation ( $r^2$ )	
			Precision (CV,%)	Accuracy (%)	Precision (CV,%)	Accuracy (%)				
UPLC	Synephrine	96.4±3.5	10	2.46	99.2±2.2	3.72	98.4±3.3	0.02	0.06	0.9999
	<i>N</i> -methyltyramine	100.9±2.3	1.5	2.88	97.3±0.0	4.74	96.7±0.1	0.01	0.04	0.9999
HPLC	Synephrine	91.0±4.7	10	3.56	99.2±3.2	4.18	98.8±3.7	0.04	0.13	0.9995
	<i>N</i> -methyltyramine	102.0±0.6	1.5	4.39	96.4±0.1	3.62	96.8±0.1	0.06	0.22	0.9997

<sup>1)</sup>LOD: Limit of detection  
<sup>2)</sup>LOQ: Limit of quantitation

**Table 3. Contents of synephrine and *n*-methyltyramine in orange fruit**

Items (mg/kg)	Orange A		Orange B		Orange C		Mandarin A		Mandarin B	
	peel	pulp	peel	pulp	peel	pulp	peel	pulp	peel	pulp
Synephrine	334.18 ±6.79	47.09 ±1.96	380.98 ±5.94	38.07 ±0.64	338.94 ±2.24	44.03 ±3.95	1,073.05 ±3.31	98.50 ±3.66	1,306.01 ±5.82	118.21 ±1.05
<i>N</i> -methyl- tyramine	1.41 ±0.09	0.51 ±0.08	2.03 ±0.13	0.27 ±0.01	2.96 ±0.09	0.52 ±0.05	3.14 ±0.10	0.14 ±0.04	4.99 ±0.07	0.56 ±0.02

All values are Mean±SD of three replications.

육에서는 1,073.05-1,306.01 mg/kg, 98.50-118.21 mg/kg으로 분석되었다. *n*-메틸티라민의 함량은 오렌지의 과피에서 1.41-2.96 mg/kg의 함량으로 분석되었으며, 과육에서는 0.27-0.52 mg/kg의 함량으로 분석되었다. 감귤의 과피에서 3.14-4.99 mg/kg, 과육에서는 0.14-0.56 mg/kg의 함량으로 분석되었다. 이는 시네프린과 *n*-메틸티라민이 과육보다 과피에 7-12배 이상 함유되어 있음을 확인하였으며, 오렌지보다 감귤에 더 높은 함량을 나타내었다. 이는 광귤의 부위별 시네프린 함량을 측정된 연구에서 외과피 1,100 mg/kg, 중과피 580 mg/kg, 전체 600 mg/kg의 결과처럼 과피의 함량이 과육보다 높다는 본 연구 결과와 일치하였다(27).

#### 오렌지 및 감귤 주스 중 함량 분석

본 연구에서 개발된 신규 분석법을 이용하여 대전 시내에서 유통 중인 오렌지 및 감귤 주스 21종에 대하여 정량 분석을 실시하였다. 제품에 대한 정량 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 주스 제품 중의 시네프린 및 *n*-메틸티라민 분석결과 과실의 분석결과와 유사한 경향을 나타냈다. 시네프린 분석결과 오렌지 주스에서는 14.61-43.25 mg/kg, 감귤 주스에서는 50.04-120.39 mg/kg의 함량으로 분석되었으며, *n*-메틸티라민은 오렌지 주스는 불검출에서 0.59 mg/kg, 감귤 주스는 0.63-3.34 mg/kg으로 분석되었다. 분석된 감귤 주스 결과 중에서 감귤 과육부분의 시네프린 및 *n*-메틸티라민 함량보다 약간 높은 수준을 나타내는 경우가 있는데, 이는 농촌진흥청(96) 보건산업진흥원(05)의 오렌지 및 감귤 식품성분표에서 과육을 감싸는 내과피의 성분인 식이섬유가 가식부의 약 1-1.6% (w/w)로 판단하였을 때, 과육은 실험 시 내과피와 과육을 모두 균질화하여 샘플로 사용하였으며, 과즙 주스는 과육을 착즙한 상태를 실험샘플로 사용하였기 때문에 이와 같은 차이를 나타내는 것으로 사료된다. 또한, Hosoda 등(8)에 따르면 시네프린의 함량은 성숙정도, 건조상태 및 품종 등에 따라 함량의 차이가 크다는 연구 결과로 미루어 보았을 때 본 실험에서 분석한 주스 시료는 과일에 존재하는 따라서 본 실험에서 분석한 주스는 과일에 존재하는 시네프린과 *n*-메틸티라민의 천연유래 범위 이내로 판단할 수 있어 오렌지 및 감귤 주스류의 안전성에 문제가 없음을 알 수 있었다.

주스 시료의 분석결과로 보아 시네프린과 *n*-메틸티라민 모두 오렌지 주스 보다 감귤 주스에서 함량이 높게 분석되었으며, 이는 Wheaton와 Stewart(19)의 연구결과에서 감귤의 시네프린 함량이 오렌지보다 5-10배 높다고 언급한 것과 일치하는 경향을 나타내었다. Mattoli 등(28)의 연구 결과에 따르면 시판 오렌지 주스의 시네프린 함량을 LC-electrospray ionization mass spectrometry를 이용하여 분석하였을 때 12-34 mg/kg의 함량을 나타내었으며 이는 본 연구결과와 유사한 함량을 나타내었다. 또한, Draquill 등(10)의 캘리포니아에서 재배한 감귤 주스에 대한 연구결과에 따르면 시네프린이 54.5-160.2 mg/kg으로 분석되었으며, 이는 본 실험의 시네프린 분석결과 50.0-120.4 mg/kg와 유사한 결과를 나

**Table 4. Contents of synephrine and *n*-methyltyramine in orange juice products**

(mg/kg)	Synephrine	<i>N</i> -methyltyramine
Orange juice A	21.71±1.95	0.17±0.06
Orange juice B	29.67±3.26	0.44±0.07
Orange juice C	43.25±1.15	N.D. <sup>1)</sup>
Orange juice D	34.42±1.88	0.53±0.03
Orange juice E	31.79±2.25	0.59±0.07
Orange juice F	29.68±2.61	0.37±0.07
Orange juice G	27.48±2.00	0.37±0.06
Orange juice H	21.09±2.35	N.D.
Orange juice I	14.61±2.59	N.D.
Orange juice J	29.06±2.11	0.13±0.03
Orange juice K	24.55±2.53	0.24±0.02
Orange juice L	25.60±2.37	0.42±0.04
Orange juice M	29.47±2.85	0.48±0.03
Mandarin juice A	50.04±0.56	1.05±0.10
Mandarin juice B	90.75±2.99	1.65±0.23
Mandarin juice C	120.39±2.32	3.34±0.08
Mandarin juice D	86.17±2.56	3.12±0.22
Mandarin juice E	96.77±1.79	3.07±0.07
Mandarin juice F	53.57±3.11	1.23±0.07
Mandarin juice G	59.24±3.62	0.63±0.03
Mandarin juice H	54.27±2.06	1.50±0.13

All values are Mean±SD of three replications.

<sup>1)</sup>N.D.: Not detected

타내었다. 본 연구에서는 국내 재배 감귤 및 시판 주스에 대한 시네프린 및 *n*-메틸티라민의 분석을 최초로 실시하였으며 이는 국내 감귤 및 제품에 대한 안전성 검증 자료로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

또한, 새롭게 개발된 UPLC-FLD를 이용한 시네프린 및 *n*-메틸티라민 분석법은 고농도로 존재하는 과실 뿐만 아니라, 미량으로 존재하는 과즙 주스 중에서의 시네프린 및 *n*-메틸티라민 정량 분석에도 적합하였다.

## 요 약

본 연구에서는 UPLC를 이용하여 시네프린과 *n*-메틸티라민을 단시간에 동시 분석할 수 있는 새로운 방법을 개발한 후 시험법에 대한 평가를 수행하였으며, 확립된 방법으로 21종의 오렌지 및 감귤 주스와 5종의 오렌지 및 감귤에서 시네프린과 *n*-메틸티라민을 정량 분석을 실시하였다. UPLC를 이용하여 분석한 결과 HPLC에 비해 분석시간을 3배 이상 단축하여 15분 이내에 분석하였고, 각 성분의 감도가 월등히 높아져 UPLC로 분석 시 시간

적, 경제적인 면에서 효율적으로 두 성분의 동시 분석이 가능하였다. UPLC 분석 시 검출한계는 시네프린과 *n*-메틸티라민이 각각 0.02 mg/L과 0.01 mg/L, 정량한계는 시네프린과 *n*-메틸티라민이 각각 0.06 mg/L과 0.04 mg/L로 설정되었다. 시네프린과 *n*-메틸티라민의 회수율은 각각 96.4%와 100.9%로 분석되었다.

확립된 분석법으로 시중에서 판매하는 오렌지 및 감귤의 과육과 과피에서 시네프린과 *n*-메틸티라민을 분석한 결과 모두 과육보다 과피에서 7-12배 이상 높은 함량을 나타내었다. 시판 오렌지 및 감귤 주스를 분석한 결과 시네프린 함량이 14.61-120.39 mg/kg으로 분석되었으며, *n*-메틸티라민은 불검출에서 3.34 mg/kg으로 분석되었다. 감귤 주스 중 과육보다 약간 높은 수준의 샘플이 있었으나 이는 천연 유래 범위 이내로 판단하였다. 따라서 본 연구에서 확립된 UPLC 분석법은 시네프린과 *n*-메틸티라민을 신속하고 효과적으로 동시 분석하는데 이용될 수 있을 것이며, 본 실험에 사용된 시중에 판매하고 있는 오렌지 및 감귤 주스는 자연에서 유래되는 허용 범위 내 함량을 나타내어 안전성에 문제가 없음을 알 수 있었다.

## References

- Kim CW, Song E. Quality characteristics of Injeulmi containing different ratios of *Citrus* Mandarin powder. Korean J. Food Nutr. 22: 293-301 (2009)
- Blumenthal M. Bitter Orange Peel and Synephrine: Part 1. American Botanical Council, Austin, TX, USA (2005)
- Hofstetter R, Kreuder J, Von Bernuth G. The effect of oxedrine on the left ventricle and peripheral vascular resistance. *Arzneimittelforschung* 35: 1844-1846 (1985)
- Legerlotz, H.  $\beta$ -Alkylamino compounds of hydroxyphenyl ethanols. U.S. Patent 1,932,347 (1933)
- Stecher PG, Finkel MJ, Siegmund OH, Szafranski BM. The Merck Index of Chemicals and Drugs. 7th ed. Merck & Co., Inc., Rahway, NJ, USA. p. 541 (1960)
- Drill VA. Pharmacology in Medicine, McGraw-Hill Book Co., Inc. New York, NY, USA. pp. 26-128 (1954)
- Sankawa U. Pharmacology, chemistry and biochemistry of "Chin-pi". J. Trad. Sino-Jap. Med. 5: 52-56 (1984)
- Hosoda K, Noguchi M, Kanaya T, Higuchi M. Studies on the preparation and evaluation of Kijitsu, the immature citrus fruits III. Relation between diameter of Kijitsu and synephrine content. *Yakugaku Zasshi* 110: 82-84 (1990)
- Masten SA. Bitter Orange (*Citrus aurantium* var. amara) Extracts and Constituents ( $\pm$ )-p-Synephrine and ( $\pm$ )-p-Octopamine. National Institute of Environmental Health Sciences, Raleigh, NC, USA (2004)
- Draquill K, Breksa AP III, Cain B. Synephrine content of juice from satsuma Mandarins (*Citrus unshiu* Marcovitch). J. Agr. Food Chem. 56: 8874-8878 (2008)
- Avula B, Upparapalli SK, Khan IA. Enantiomeric separation of adrenergic amines in *Citrus* species, related genera and dietary supplements by capillary electrophoresis. *Chromatographia*. 62: 151-157 (2005)
- Stewart I, N William F, Edwards GJ. The isolation and identification of *l*-synephrine in leaves and fruit of citrus. J. Biol. Chem. 239: 930-932 (1964)
- Kakimoto Y, Armstrong MD. On the identification of octopamine in mammals. J. Biol. Chem. 237: 422-427 (1962)
- Stewart I. Determination of ornithine, lysine, arginine, citrulline and histidine. J Chromatogr. 10: 404-407 (1963)
- Pellati F, Benvenuti S. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of phenethylamine alkaloids in *Citrus aurantium*. J. Chromatogr. A. 1161: 71-88 (2007)
- Pellati F, Benvenuti S, Melegari M, Firenzuoli F. Determination of adrenergic agonists from extracts and herbal products of *Citrus aurantium* L. var. amara by LC. J. Pharm. Biomed. Anal. 29: 1113-1119 (2002)
- Niemann RA, Gay ML. Determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements by column-switching cation exchange high-performance liquid chromatography with scanning-wavelength ultraviolet and fluorescence detection. J. Agr. Food Chem. 51: 5630-5638 (2003)
- Penzak SR, Jann MW, Cold JA, Hon YY, Desai HD, Gurley BJ. Seville (sour) orange juice: synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults. J. Clin. Pharmacol. 41: 1059-1063 (2001)
- Wheaton TA, Stewart I. Quantitative analysis of phenolic amines using ion-exchange chromatography. Anal. Biochem. 12: 585-592 (1965)
- Villiers de A, Lestremay F, Szucs R, Gelebart S, David F, Sandra P. Evaluation of ultra performance liquid chromatography Part I. Possibilities and limitations. J. Chromatogr. A. 1127: 60-69 (2006)
- Korea Food and Drug Administration. The Handbook for the Method Validation Guidelines about Drug Products. Administrative Publications, Seoul, Korea. 11-1470000-001693-01 (2008)
- Evans RL, Siitonen PH. Determination of caffeine and sympathomimetic alkaloids in weight loss supplements by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. Sci. 46: 61-67 (2008)
- Roman MC, Betz JM, Hildreth J. Determination of synephrine in bitter orange raw materials extracts and dietary supplements by liquid chromatography with ultraviolet detection: Single-laboratory validation. J. AOAC Int. 90: 68-81 (2007)
- Santana J, Sharpless KE, Nelson BC. Determination of *para*-synephrine and *meta*-synephrine positional isomers in bitter orange-containing dietary supplements by LC/UV and LC/MS/MS. Food Chem. 109: 675-682 (2008)
- MacDougall D, Crummett WB. Guidelines for data acquisition and data quality evaluation in environmental chemistry. Anal. Chem. 52: 2242-2249 (1980)
- Guillarme D, Nguyen DT, Rudaz S, Veuthey JL. Recent developments in liquid chromatography-impact on qualitative and quantitative performance. J. Chromatogr. A. 1149: 20-29 (2007)
- Mercolini L, Mandrioli R, Trere T, Buqamelli F, Ferranti A, Raqqi MA. Fast CE analysis of adrenergic amines in different parts of *Citrus aurantium* fruit and dietary supplements. J. Sep. Sci. 33: 2520-2527 (2010)
- Mattoli L, Canqi F, Maidecchi A, Ghiara C, Tubaro M, Traldi P. A rapid liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry method for evaluation of synephrine in *Citrus aurantium* L. samples. J. Agr. Food Chem. 53: 9860-9866 (2005)